

**Expression dendritischer Zellen, Immunzellen, Chemokinen,
Chemokinrezeptoren, HLA-DR, zytotoxischer und regulatorischer T-
Lymphozyten in stabilen versus instabilen atherosklerotischen Plaques**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr.med)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von: Yevgeniya Atiskova
geboren am 08.12.1989 in Kiew

Gutachter

- 1. PD Dr. Atilla Yilmaz, Schmalkalden**
- 2. PD Dr. Marcus Franz, Jena**
- 3. Prof. Dr. Stephan Achenbach, Erlangen**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.04.2016

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| <u>1. Zusammenfassung</u> | 3 |
| <u>2. Einleitung</u> | 5 |
| 2.1 Atherosklerose | 5 |
| 2.1.1 Atherogene Risikofaktoren..... | 5 |
| 2.1.2 Pathogenese | 6 |
| 2.1.3 Klinische Bedeutung..... | 11 |
| 2.2 Rolle von Entzündungszellen in Atherosklerotischen Läsionen | 13 |
| 2.2.1 Makrophagen..... | 13 |
| 2.2.2 Dendritische Zellen..... | 14 |
| 2.2.3 T-Lymphozyten..... | 16 |
| 2.2.4 Regulatorische T- Lymphozyten..... | 18 |
| 2.2.5 Natürliche Killerzellen..... | 21 |
| 2.2.6 Chemokinrezeptoren..... | 22 |
| 2.3 Ziel und Fragestellung der vorliegenden Arbeit | 23 |
| <u>3. Material und Methoden</u> | 24 |
| 3.1 Gewinnung humaner Präparate der Arteria carotis interna | 24 |
| 3.2 Aufarbeitung des Materials | 26 |
| 3.3 Histologische und immunhistochemische Färbungen | 28 |
| 3.3.1 Trichromfärbung nach Masson..... | 28 |
| 3.3.2 Immunhistochemie..... | 30 |
| 3.4 Einteilung der atherosklerotischen Plaques | 39 |
| 3.5 Digitale Quantifizierung immunhistochemisch gefärbter Zellen | 40 |
| 3.6 Statistische Auswertung | 41 |
| <u>4. Ergebnisse</u> | 42 |
| 4.1 Vorhandensein von Immunzellen in stabilen, instabilen Plaques und Kontrollgewebe | 42 |
| 4.1.1 Monozyten/ Makrophagen..... | 42 |
| 4.1.2 Dendritische Zellen..... | 43 |
| 4.1.3 T-Lymphozyten..... | 50 |
| 4.2 Expression von Chemokinrezeptoren | 56 |

| | |
|--|------------|
| 4.3 Nachweis von Immunzellen in bestimmten Plaqueregionen..... | 58 |
| 4.4 Korrelation verschiedener Immunzellen und Immunmarker..... | 60 |
| 4.4.1 Korrelation proinflammatorischer Immunzellen miteinander..... | 60 |
| 4.4.2 Korrelation proinflammatorischer Immunzellen mit Aktivierungsmarkern..... | 66 |
| 4.4.3 Korrelation proinflammatorischer T-Lymphozyten mit Chemokinrezeptoren..... | 70 |
| 4.4.4 Korrelation regulatorischer T-Lymphozyten mit proinflammatorischen Zellen und Chemokinrezeptoren..... | 71 |
| 4.5 Klinische Daten..... | 74 |
| 4.5.1 Korrelation verschiedener Immunzellen mit klinischen Daten..... | 75 |
| <u>5. Diskussion.....</u> | 77 |
| <u>6. Schlussfolgerung.....</u> | 87 |
| <u>7. Literaturverzeichnis.....</u> | 88 |
| <u>8. Tabellenverzeichnis.....</u> | 94 |
| <u>9. Abbildungsverzeichnis.....</u> | 95 |
| <u>10. Abkürzungsverzeichnis.....</u> | 99 |
| <u>11. Lebenslauf.....</u> | 101 |
| <u>12. Ehrenwörtliche Erklärung.....</u> | 102 |

1. Zusammenfassung

Die Atherosklerose ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung der Gefäßwand mittel- und großkalibriger Arterien, von der angenommen wird, dass die Präsentation von Autoantigenen durch Dendritische Zellen (DCs) zu einer Aktivierung von T-Zellen führt, und damit den Entzündungsprozess in der Gefäßwand fördert. Es wird vermutet, dass antiinflammatorische Zellen wie Tregs dem inflammatorischen Prozess bei der Atherogenese entgegenwirken.

In der vorliegenden Arbeit wurden 29 Gefäßpräparate, die nach Carotis- und Femoralis-Thrombendarteriektomie gewonnen wurden sowie 12 "gesunde" Gefäßpräparate, die aus der Rechtsmedizin von Unfallopfern entnommen wurden, in histologischen Gefäßquerschnitten aufbereitet. Diese Präparate wurden mittels einer Trichromfärbung behandelt, was es ermöglichte, instabile und stabile Läsionen nach zuvor etablierten morphologischen Kriterien zu unterscheiden. Durch immunhistochemische Färbungen der Schnitte erfolgte der Nachweis von myeloiden DCs (Fascin⁺, S100⁺ und CD209⁺), reifen myeloiden DCs (CD83⁺), T-Lymphozyten (CD3⁺), T-Helfer-Zellen (CD4⁺), zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8⁺), Natürlichen Killerzellen (CD161⁺), aktivierten T-Lymphozyten (CD25⁺), Chemokinrezeptoren (CCR4⁺, CCR6⁺) sowie regulatorischen T-Zellen (Tregs, FoxP3⁺). Auch wurde die Expression von HLA-DR, das der Antigenpräsentation dient, immunhistochemisch untersucht.

Folgende Ergebnisse wurden beobachtet: In instabilen Plaques wurden signifikant mehr proinflammatorische Zellen wie DCs, T Helferzellen, zytotoxische T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen im Vergleich zu stabilen Plaques sowie Kontrollgewebe nachgewiesen. Zudem zeigten sich in instabilen Läsionen eine vermehrte Expression von HLA-DR und eine höhere T-Zell Aktivität. Hingegen wiesen instabile Läsionen signifikant weniger Tregs auf als stabile Plaques. Es wurde eine signifikante inverse Korrelation zwischen myeloiden DCs (mDCs) und Tregs nachgewiesen. In Plaques von Patienten, die mit Statinen behandelt wurden, zeigten sich signifikant weniger proinflammatorische Zellen und mehr Tregs als in Läsionen von Patienten ohne Statintherapie.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, lässt sich vermuten, dass das Ungleichgewicht zwischen Inflammation und Anti-Inflammation bei der Atherosklerose eine Plaquestabilisierung bewirkt und somit einen Einfluss auf die Destabilisierung von Atheromen mit konsekutiv ischämischen Syndromen hat. Ein Einfluss dieser Immunzellen auf

Krankheiten wie Myokardinfarkt und Apoplex, welche eine enorm wichtige Rolle in unserer Gesellschaft einnehmen, ist anzunehmen.

2. Einleitung

2.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine chronische entzündliche Erkrankung der Intima mittel- und großkalibriger Arterien (Andersson et al. 2010, Businaro 2013). Während dieses Prozesses bilden sich Ablagerungen, sogenannte Plaques, welche hauptsächlich aus Lipiden und extrazellulären Matrixproteinen, vor allem Kollagen, bestehen. Diese systemische Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine fokale Manifestation. Einige Gefäße wie die Arteria thoracica interna sind kaum, andere hingegen wie z.B. die Koronararterien sind häufig betroffen (Davies und Woolf 1993). Erste atherosklerotische Veränderungen beginnen schon in der Kindheit (Tuzcu et al. 2001, Sary et al. 1995, Palinski und Napoli 1999, Lusis 2000, Santos et al. 2008). Die Atherosklerose wird durch viele verschiedene endogene sowie exogene Risikofaktoren und nicht nur, wie früher angenommen, durch eine Hypercholesterinämie und die Ablagerung von Fetten verursacht. Es ist ein dynamischer, multifaktoriell bedingter, entzündlicher Prozess.

2.1.1 Atherogene Risikofaktoren

Beeinflussbare Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose sind Hypercholesterinämie, Hypertonie, Rauchen, Bewegungsmangel, Übergewicht und Diabetes mellitus. Zur Hypercholesterinämie ist anzumerken, dass dem LDL Cholesterin zwar eine proatherogene Rolle zukommt, es jedoch auch eine Cholesterinform (HDL Cholesterin) gibt, welche atheroprotektiv wirkt. Die arterielle Hypertonie bewirkt über verschiedene Mechanismen, wie eine gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und dem Endotheliumderived Contracting Factor, eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit sowie die Beeinflussung des Renin Angiotensin Aldosteron Systems eine Schädigung des Endothels (Mudau et al. 2012). Zigarettenrauchen beeinflusst in vielfältiger Weise die Entstehung der Atherosklerose, u.a. fördert eine verminderte Stickstoffoxid-Verfügbarkeit und ein zu Gunsten von LDL verschobener LDL/HDL-Quotient die Entstehung atherosklerotischer Plaques. Zudem entstehen viele freie Radikale und endogene reaktive Sauerstoffspezies (Mudau et al. 2012). Sportliche Betätigung hat einen positiven Einfluss auf viele verschiedene Risikofaktoren (Santos et al. 2008). Die Adipositas ist häufig ursächlich für die Entstehung der Hyperlipidämie oder des Diabetes mellitus (Lim et al. 2011). Der Diabetes mellitus Typ 1

und 2 begünstigen die endotheliale Dysfunktion (Mudau et al. 2012). Chronischer Stress wirkt ebenfalls proatherogen (Businaro 2013). Unbeeinflussbare Risikofaktoren sind z.B. die familiäre Disposition, steigendes Alter und das männliche Geschlecht (Santos et al. 2008). Für verschiedene bakterielle und virale Erreger gibt es Hinweise auf eine proatherogene Wirkung (Kurano und Tsukamoto 2011, Levi et al. 2012). Das Endothel der Arterien wird nicht nur durch systemische und inflammatorische, sondern auch durch mechanische Faktoren beeinflusst, die durch den Blutfluss und die Herzaktion entstehen (Jashari et al. 2013). Prädisponierend für die Entstehung der Atherosklerose können bestimmte Formen der Gefäße wie Abzweigungen, Bifurkationen oder Biegungen sein, die einen veränderten Blutfluss bewirken (Chiu und Chien 2011). Es wird angenommen, dass Gebiete, in denen niedriger Scherstress dominiert, anfällig für atherosklerotische Veränderungen sind (Gimbrone und Garcia-Cardena 2013, Jashari et al. 2013). Dabei ist Stickstoffoxid der vermittelnde Faktor des atheroprotektiven Effekts von Scherstress auf die Gefäßwand (Jashari et al. 2013). Ist das Endothel beschädigt, können verschiedene Moleküle oder Zellen die Intima invadieren und auf den weiteren Verlauf der Atherosklerose wirken.

2.1.2 Pathogenese

Die erste sichtbare Erscheinung der Atherosklerose ist der „fatty streak“ (Abb. 1). Dies ist eine Ansammlung von Schaumzellen in der Intima einer Arterie (Crowther 2005). Nach dieser manchmal bereits im Kindesalter sichtbaren Läsion erfolgen jedoch noch weitere Veränderungen der Gefäßwand, die zur Entstehung der atherosklerotischen Plaque führen (Libby 2006). Ursächlich für die Entstehung der Atherosklerose ist in einem ersten Schritt eine Störung der endothelialen Funktion. Wahrscheinlich werden zunächst durch mehrere Faktoren, wie z.B. turbulenten Fluss und ungünstige Serumlipidkonzentrationen, Schädigungen des Endothels initiiert (Crowther 2005). Daraufhin wird vermehrt der Adhäsionsfaktor VCAM-1 von den Endothelzellen gebildet. Die Expression dieses Faktors erleichtert die Adhäsion und Einwanderung von Immunzellen, wie z.B. Monozyten und T-Lymphozyten, in Regionen mit geschädigtem Endothel (Libby 2006). Es wird weiterhin die Einwanderung von Molekülen wie LDL Cholesterin (Low density Lipoprotein) und die Freisetzung von Zytokinen gefördert (Libby 2006, Crowther 2005). Das LDL Cholesterin wird in Abhängigkeit von seiner Serumkonzentration im subendothelialen Gewebe eingelagert (Lusis 2000). Dort wird es unter dem Einfluss von freien Radikalen oxidiert. Das oxidierte LDL Cholesterin aktiviert die Endothelzellen, welche Chemokine und Zytokine

sezernieren und vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimieren. Dieses bewirkt eine weitere verstärkte Anlagerung von Entzündungszellen, wie z.B. Makrophagen, an das Endothel und deren Transmigration in die Intima. Das Wachstum der atherosklerotischen Plaque wird gefördert (Crowther 2005). Das oxLDL Cholesterin in der Gefäßwand fördert die Umwandlung von Monozyten in Makrophagen. Dieser Effekt wird durch die Aktivierung des M-CSF-Rezeptors vermittelt (Fuhrman et al. 2008). Die Makrophagen binden oxidiertes LDL Cholesterin, welches sich in der Intima befindet, über den Scavenger Rezeptor, nehmen es auf und verwandeln sich hierdurch in sogenannte Schaumzellen, in denen Lipide in Vakuolen gelagert sind. Die Zellen werden unbeweglich und akkumulieren in der Intima (Crowther 2005).

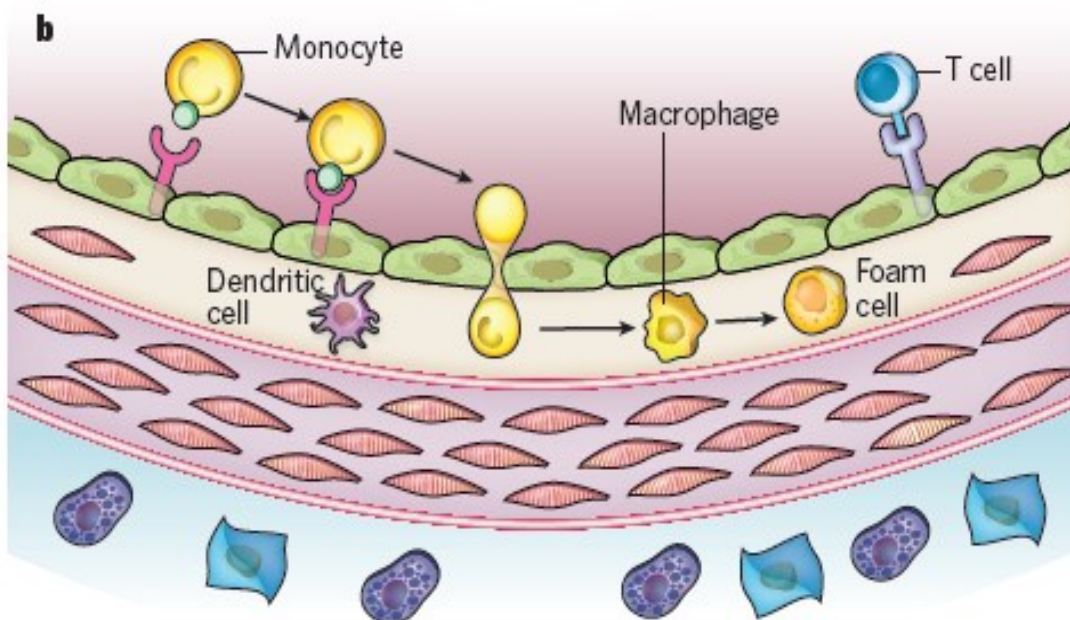


Abb. 1: Erste atherosklerotische Veränderungen in der Arterienwand (modifiziert nach Libby, 2011)

Daraufhin setzen in die Intima eingewanderte Leukozyten MCP-1 frei, welches wiederum weitere Leukozyten anlockt und diese aktiviert. Es wandern glatte Muskelzellen aus der Media in die Intima ein. Diese proliferieren dort und bilden verstärkt extrazelluläre Matrixmoleküle, wie Kollagen, Elastin und Proteoglycane (Abb. 2) (Libby et al. 2011). Des Weiteren produzieren sie verschiedene inflammatorische Mediatoren, wie z.B. IL-1- β , TNF α und β , IL-6, M-CSF, IL-18 und CD-40. Diese beschleunigen unter anderem die Mitogenese, Matrixproliferation, Angiogenese und die Entstehung von Schaumzellen. Letztere schütten Zytokine und diverse andere proinflammatorische Mediatoren aus, wodurch noch mehr glatte

Muskelzellen angelockt und zur Proliferation stimuliert werden sowie die LDL-Oxidierung und das Einwandern weiterer Monozyten gefördert wird (Abb. 2). Auch die endotheliale Dysfunktion nimmt durch diese Prozesse weiter zu (Crowther 2005). Ein weiterer Schritt in dieser Entzündungskaskade ist, dass DCs und Makrophagen, die oxidiertes LDL Cholesterin in das Zellinnere aufgenommen haben, dieses als Autoantigen zusammen mit MHC II-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Die in die Intima eingewanderten T-Lymphozyten erkennen das Ihnen präsentierte Antigen und werden dadurch aktiviert. Dieser Vorgang setzt eine Immunkaskade in Gang, in dessen Rahmen es zu einer Ausschüttung von IFN- γ kommt und damit zu einem weiteren Fortschreiten der Läsion (Andersson et al. 2010, Hansson et al. 1989). Unter dem Einfluss dieser Entzündungssituation kommt es auch zu einer Einsprossung von Gefäßen aus der Adventitia in die Intima (Neovaskularisation). Durch die Neovaskularisation wird die Rekrutierung von Entzündungszellen in die Intima noch gesteigert, aber es kommt auch zu einer Destabilisierung der Intima, sodass Einblutungen in die Gefäßwand die Folge sind. Thrombozyten und Erythrozyten werden daraufhin durch die Makrophagen phagozytiert. Dadurch kommt es zu einer intrazellulären Eisenablagerung (Kockx et al. 2003). Die Größe der Plaques nimmt durch die fortschreitende Akkumulation der Schaumzellen, zunehmende Lipideinlagerung, Proliferation der glatten Muskelzellen sowie Zunahme der Matrixmoleküle immer weiter zu (Crowther 2005). Dabei kommt es bei Überschreiten einer kritischen Grenze der Phagozytose zur Apoptose von Schaumzellen, sodass deren Zellinhalt wieder in der Gefäßwand freigesetzt wird. Dies bewirkt, dass durch die Ablagerung von apoptotischen Zellen, Debris und freien Lipiden sich ein nekrotischer Kern (Lipidkern) in der Plaque bildet. Dieser wird durch eine fibröse Kappe, bestehend aus glatten Muskelzellen und den von diesen gebildeten extrazellulären Matrixproteinen, v.a. kollagenen Fasern, vom Gefäßlumen abgegrenzt. Dies führt zu einer Stabilisierung des Atheroms (Weber und Noels 2011).

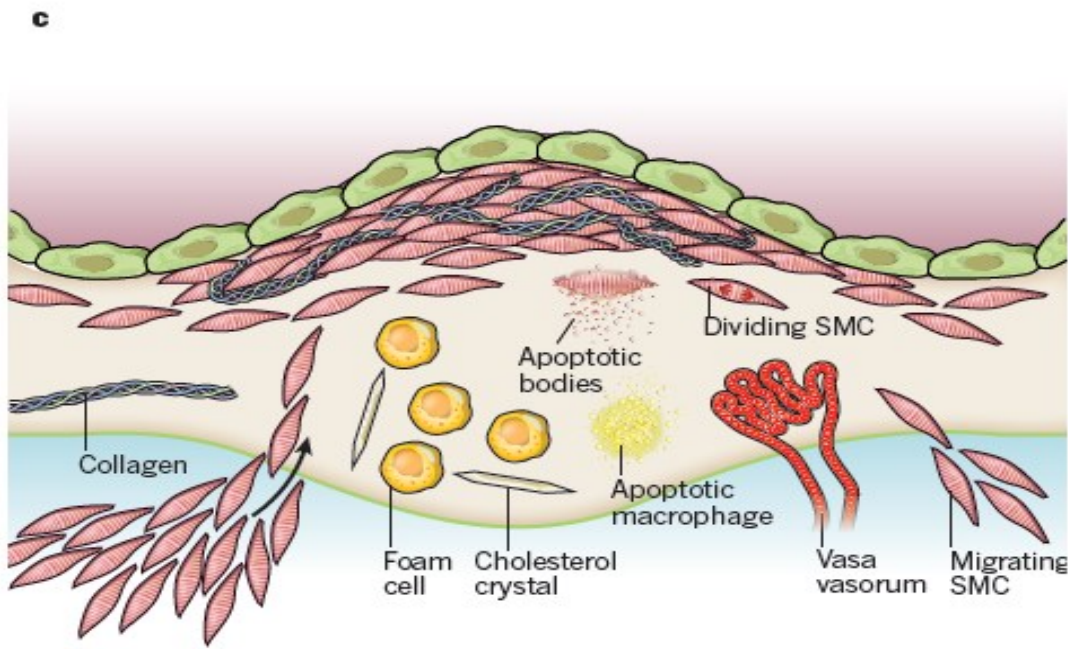


Abb. 2: Fortschreiten der atherosklerotischen Veränderungen (modifiziert nach Libby, 2011)

Im Rahmen der Plaquestabilisierung nimmt die Anzahl der Makrophagen bzw. Schaumzellen im Lipidkern immer weiter zu, sodass dieser immer größer wird. Kollagene Fasern und glatte Muskelzellen werden zunehmend abgebaut. Die fibröse Kappe wird immer dünner, sodass die Wahrscheinlichkeit einer Plaqueruptur steigt (Abb. 3) (Weber und Noels 2011). Durch inflammatorische Zellen wird dies begünstigt, indem sie den Abbau kollagener Fasern durch die Bildung entsprechender Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen fördern, und auch Mediatoren (z.B. $\text{IFN-}\gamma$) ausschütten, welche die glatten Muskelzellen direkt schädigen und somit deren Bildung kollagener Fasern reduzieren (Libby 2009, Libby et al. 2011). Das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren entscheidet über die Entwicklung, Stabilität sowie klinische Folgen der atherosklerotischen Läsion (Libby 2008). Einige Plaques weisen ein stark beschleunigtes Wachstum auf. In diesen Fällen wird angenommen, dass intraatheromatöse Einblutungen das Plaquewachstum erheblich beschleunigen (Crowther 2005). Die Neovaskularisation ist innerhalb der Läsion ein erheblicher Risikofaktor für die Ruptur, da die Stabilität der fibrösen Kappe beeinträchtigt wird (Moreno et al. 2004). Kommt es letztendlich zum Einriss der fibrösen Kappe, so tritt der prokoagulatorische Lipidkern, welcher viel Gewebsthromboplastin enthält, mit Gerinnungsfaktoren im Blut in Kontakt. Die Gerinnungskaskade wird ausgelöst und Thrombozyten werden aktiviert (Abb. 3). Klinische ischämische Symptome werden hervorgerufen durch den partiellen oder kompletten Verschluss des Gefäßes oder die

Embolisation des Thrombus. Flusslimitierende stabile Stenosen, welche Gewebischämien zur Folge haben, sind seltener die Ursache für akute ischämische Symptome (Libby 2009, Libby et al. 2011). Ist die Thrombose unvollständig, kann die atherosklerotische Plaque dennoch enorm an Größe zunehmen durch die Aktivierung der Thrombozyten und die Ausbreitung des Platelet derived growth factor auf der Oberfläche der Plaque. Akute Symptome treten ebenfalls auf (Crowther 2005).

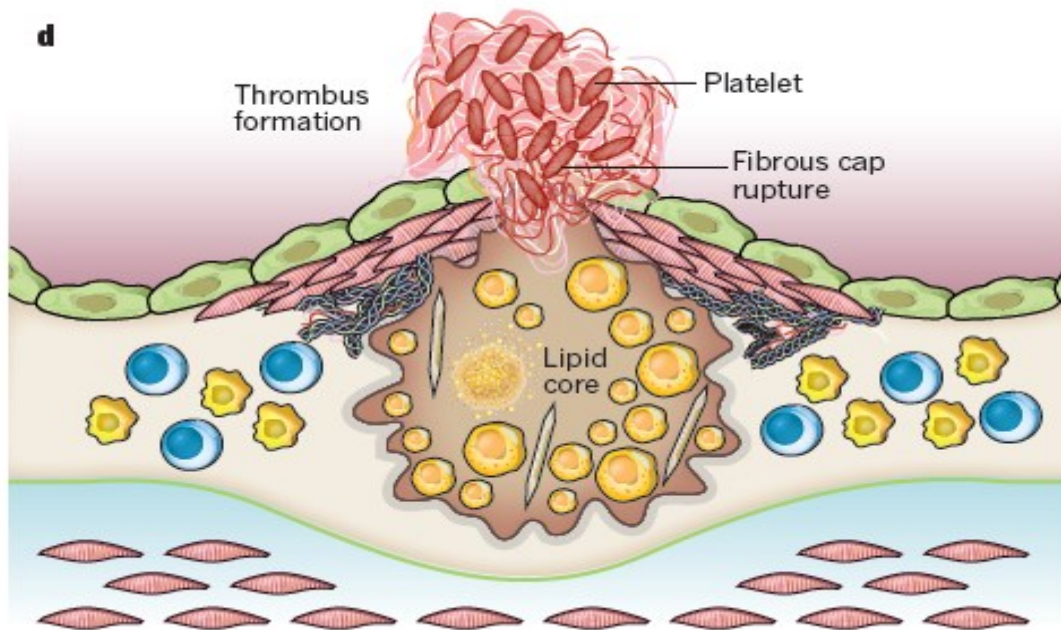


Abb. 3 Ruptur einer instabilen Plaque (modifiziert nach Libby, 2011)

Entsprechend morphologischer Kriterien können atherosklerotische Läsionen in stabile und instabile Läsionen eingeteilt werden (Yilmaz et al. 2004) (Tab. 1)

| Stadium | Lipidkern/Gesamt- Plaque-Verhältnis | Dicke der fib- rösen Kappe | Neovaskularisation |
|------------------|--|-------------------------------|--------------------|
| Stabile Plaque | <0,5 | >100µm | Nein |
| Instabile Plaque | >0,5 / Verschluss | <100µm / rupturiert | Ja |

Tab. 1: Einteilung der Plaques (Yilmaz et al. 2004)

Die Neovaskularisation ist die Folge der Atherosklerose, der Gewebhypoxie und der vaskulären Entzündung (Moreno et al. 2006). Die durch Hypoxie ausgelöste Stabilisierung

und damit Aktivierung des HIF 1 α spielt durch Beeinflussung von Stickstoffoxid-Synthase und Vascular Endothelial Growth Factor eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese in den Plaques (North et al. 2005). Die Neovaskularisation entsteht durch die aus den Venulen einwandernden Endothelzellen der Adventitia, die sich dann in der Intima zu neuen Kapillaren formieren (Frantz et al. 2005). Die neu gebildeten Gefäße dienen als Eintrittspforte für die Einwanderung von Leukozyten in die Plaque (Moreno et al. 2006).

2.1.3 Klinische Bedeutung

Die Atherosklerose kann sich klinisch von einem asymptomatischen Stadium bis zu Gefäßverschlüssen mit konsekutiver Organinsuffizienz äußern. Verschiedene Erkrankungen sind Folge der Atherosklerose. Die häufigsten verursachten Symptome sind: Myokardinfarkt, Angina pectoris, Apoplex, transitorisch ischämische Attacke, prolongiertes reversibles ischämisches neurologisches Defizit, pAVK. Initiale Läsionen, die zum Teil schon im Kindesalter vorkommen können, sind klinisch noch nicht relevant. Im zunehmenden Alter können sich die Läsionen unter dem Einfluss zusätzlicher Risikofaktoren zu komplexen Plaques entwickeln. Eine Minderversorgung der Organe, Organschädigung bis zu Organinsuffizienz sind die Folgen. Häufigste schwere akute ischämische Ereignisse bei Ruptur atherosklerotischer Plaques sind dabei der Myokardinfarkt oder der Apoplex (Lusis 2000). Betrachtet man die Todesursachenstatistiken der WHO, so zeigt sich, dass weltweit die ischämische Herzkrankheit an erster Stelle und zerebrovaskuläre Erkrankungen an zweiter Stelle der Todesursachen stehen (WHO 2014). Laut der Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes für das Jahr 2013 sind die ischämische Herzkrankheit und der Myokardinfarkt in Deutschland die häufigsten Todesursachen (Bundesamt 2014). In höher entwickelten Ländern sind über 50% der Todesursachen auf die Atherosklerose zurückzuführen (Roger et al. 2011). Zur Prävalenz der durch Atherosklerose bedingten Erkrankungen ist folgendes zu nennen: In Deutschland leiden 28% der Männer und 18% der Frauen über 65 Jahre an KHK (Debus 2013). Die Prävalenz der pAVK liegt bei 10-15% (Haigh et al. 2013). Je nach Alter und Geschlecht weisen bis 11% der Bevölkerung asymptomatische ACI-Stenosen auf (de Weerd et al. 2010). Die Prävalenz der Atherosklerose ist in den Industrienationen in den letzten 10 Jahren um 13,1% gestiegen (Debus 2013). Analysiert man diese Ergebnisse, so ist offensichtlich, dass atherosklerotische Veränderungen eine entscheidende klinische Rolle in unserer Gesellschaft spielen. Aus diesen Gründen ist die Erforschung der Ursachen, Einflüsse sowie möglicher Therapien von hoher Bedeutung. Die

Atherosklerose der Arteria Carotis interna kann asymptomatisch sein, jedoch auch verschiedene Symptome bewirken. Die Verminderung der Durchblutung und somit Minderversorgung des Gehirns kann Ursache für verschiedenste Störungen wie Sprachstörungen, motorische Einschränkungen, veränderte Sinneswahrnehmungen oder vegetative Störungen sein. Die Symptome einer ACI-Stenose können auch Bewusstseinsstörungen und psychische Auffälligkeiten sein. Eine transitorisch ischämische Attacke, eine akute zerebrale Ischämie mit Ausfallserscheinungen bis max. 24 Stunden, kann auftreten (Amann 2012). Rupturiert eine Plaque, so können sich Teile ablösen und es kommt zur arterioarteriellen Embolie, welche einen Apoplex zur Folge hat, der zu einem irreversiblen neurologischem Defizit oder sogar zum Tod führen kann. ACI-Stenosen neigen zur Progression über Jahre (Liapis et al. 2000). Auch Plaques der Arteria femoralis können asymptomatisch und symptomatisch sein. Das typische Symptom der Arteria femoralis Stenose ist die Claudicatio intermittens und das zugehörige Krankheitsbild ist die pAVK. Die Patienten haben dabei je nach Stadium keine Beschwerden oder unterschiedlich starke Schmerzen in den Beinen beim Gehen oder auch in Ruhe. In fortgeschrittenen Stadien werden Ulcera und Gangrän beobachtet (McDermott et al. 2011). In der folgenden Tabelle 2 ist die Klassifikation der pAVK nach Fontaine und Rutherford aufgeführt.

| Fontaine | | Rutherford | | |
|----------|--------------------------|------------|-----------|----------------------------------|
| Stadium | Klinisches Bild | Grad | Kategorie | Klinisches Bild |
| I | Asymptomatisch | 0 | 0 | Asymptomatisch |
| IIa | Gehstrecke >200m | I | 1 | Leichte Claudicatio intermittens |
| IIb | Gehstrecke <200m | I | 2 | Mäßige Claudicatio intermittens |
| | | I | 3 | Schwere Claudicatio intermittens |
| III | Ischämischer Ruheschmerz | II | 4 | Ischämischer Ruheschmerz |
| IV | Ulcus, Gangrän | III | 5 | Kleinflächige Nekrose |
| | | III | 6 | Großflächige Nekrose |

Tab. 2: Klassifikation der pAVK nach Fontaine und Rutherford

2.2 Rolle von Entzündungszellen in Atherosklerotischen Läsionen

Inflammatorische Prozesse haben Einfluss auf die Entstehung und Progression von atherosklerotischen Läsionen. So wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen, dass dendritische Zellen, Makrophagen, Mastzellen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen und weitere Immunzellen an atherosklerotischen Vorgängen beteiligt sind (Vanderlaan und Reardon 2005, Libby et al. 2010). Nachfolgend werden einige Immunzellen beschrieben, deren Vorkommen in den Plaques sowie Kontrollgefäßen in dieser Arbeit untersucht wurden.

2.2.1 Makrophagen

Der Phänotyp der Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen kann stark von großen lipidgeladenen Schaumzellen bis zu kleinen inflammatorischen Zellen variieren. Diese komplexe Entwicklung ist von der Interaktion der umgebenden Zellen, Mediatoren und Zytokine abhängig (Wolfs et al. 2011). IL-4, IL-13, IL-1, Vitamin D3 sowie IFN γ haben unter anderem in diesem Prozess einen Einfluss auf die Funktion der Makrophagen (Galkina und Ley 2009).

Diese beeinflussen wiederum den Lipidstoffwechsel sowie immunologische Reaktionen, indem sie inflammatorische Mediatoren und Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, TNF und MIF produzieren (Ilhan und Kalkanli 2015). Jedoch können Makrophagen auch antiinflammatorische Mediatoren wie IL-10 und TNF- β ausschütten (Ilhan und Kalkanli 2015).

Die Aufnahme von oxidiertem LDL bewirkt, dass sie sich aufgrund der Anreicherung von Cholesterin im Zellinneren in Schaumzellen umwandeln. Die Erhöhung des Cholesteringehalts resultiert vorrangig aus der Hochregulation der Expression von Scavenger-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und somit der erhöhten Aufnahme von Cholesterin (Tano et al. 2012). Glatte Muskelzellen proliferieren und die Aktivierung des Endothels wird aufrechterhalten, wodurch zirkulierende Monozyten verstärkt angelockt werden. Die weitere Migration von Monozyten in die atherosklerotische Läsion steigert den Zellgehalt und die Komplexität der Läsion (Tano et al. 2012).

2.2.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind professionell antigenpräsentierende Zellen, welche fremde und potentiell gefährliche Antigene erkennen und T-Lymphozyten präsentieren. Sie wandern in das Zielgewebe ein und verharren dort an Stellen, wo potentiell Antigene eintreten können. Dort haben unreife DCs eine Wächterfunktion und prüfen kontinuierlich und effizient die Antigene ihrer Umgebung. Nach dem Kontakt und der Aufnahme fremder (mikrobieller) Antigene wandern DCs in die nächstgelegenen Lymphknoten ein und präsentieren die Antigene naiven oder ruhenden T-Lymphozyten, welche dadurch aktiviert werden und eine Immunreaktion auslösen. Im Falle von Selbstantigenen ist das Gegenteil der Fall. Nach Kontakt mit entsprechenden T-Lymphozyten tritt bei diesen eine Apoptose auf, sie werden in einen Ruhezustand versetzt oder es entstehen regulatorische T-Lymphozyten (Perrins und Bobryshev 2011). DCs sind in der Lage die Differenzierung, Migration und Aktivierung $CD4^+$ T-Lymphozyten unter Nutzung von Zell-Zell-Kontakten oder durch Zytokinproduktion zu beeinflussen (Wojas und Pajtasz-Piasecka 2010). Kommt es zur Infektion oder Gewebeschädigung, nehmen DCs die Antigene auf. Inflammatorische Signale bewirken die Aktivierung und funktionelle Umwandlung zu reifen DCs. Dann migrieren diese in sekundäre lymphatische Organe, wo die Reifung abgeschlossen wird (Van Vre et al. 2011). Die reifen DCs prozessieren die aufgenommenen Antigene und präsentieren diese gebunden an die Oberflächenmoleküle MHC I oder II. Kostimulatorische Moleküle werden hochreguliert und verschiedene Zytokine ausgeschüttet. Durch direkten Zell-Zell-Kontakt werden naive T-Lymphozyten aktiviert (van Spriel und de Jong 2013, Perrins und Bobryshev 2011, Bobryshev 2010). Daraufhin wird eine primäre oder sekundäre Immunantwort ausgelöst und die T-Lymphozyten differenzieren zu Th1-oder Th2-Effektorzellen. DCs spielen jedoch auch eine Rolle im angeborenen Immunsystem. Sie schütten als Antwort auf Fremdartigene Zytokine aus, welche unspezifisch protektiv wirken. Diese Zytokine aktivieren unter anderem T-Lymphozyten, NKT-Zellen und NK-Zellen (Perrins und Bobryshev 2011). Es werden zwei Arten dendritischer Zellen unterschieden. Myeloide DCs (mDCs) können bakterielle Infektionen und weitere Pathogene abwehren. Sie sekretieren unter anderem IL 12 und sind in der Lage, Th1-Zellen zu aktivieren (Nizzoli et al. 2013). Plasmacytoide DCs (pDCs) sind dagegen an der Abwehr von Viren mittels Ausschüttung von IFN beteiligt. Sie können Th1- und Th2-Antworten hervorrufen (Nizzoli et al. 2013). pDCs sind stärker an Prozessen zur Aufrechterhaltung der Immuntoleranz beteiligt (Chen et al. 2013).

Bereits 1995 beschrieben Bobryshev und Lord das Vorhandensein von DCs in atherosklerotischen Läsionen der arteriellen Intima gesunder Menschen (Bobryshev und Lord 1995). Sie wurden zusammen mit T-Lymphozyten in Plaques in Bereichen mit Neovaskularisation und in der Nähe der Vasa vasorum in der Adventitia beobachtet (Galkina und Ley 2009). Schon bevor sich eine atherosklerotische Läsion entwickelt, sind DCs in der arteriellen Intima zu finden (Vanderlaan und Reardon 2005). Dort spielen sie eine entscheidende Rolle in der Früherkennung im Blut enthaltener gefährlicher Antigene (Perrins und Bobryshev 2011). Es wurde gezeigt, dass in atherosklerotischen Plaques vorhandenes oxidiertes LDL zur Induktion der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in DCs beiträgt und somit die DC-Reifung und Differenzierung beeinflusst (Nickel et al. 2009). Arterien, die atherosklerotisch verändert sind, weisen deutlich mehr DCs auf (Bobryshev 2010). Bezüglich des möglichen Eintrittsweges zirkulierender DCs in das Atherom gibt es zwei Hypothesen: 1. Zirkulierende DCs könnten durch das luminale Endothel in die Intima eintreten. 2. Die Einwanderung von DCs in die Intima könnte auch über die Neovaskularisation aus der Adventitia erfolgen. DCs werden als Teil des angeborenen Immunsystems durch danger-associated molecular patterns, pathogen-associated molecular patterns und endogene Gefahrensignale aktiviert. Eine wichtige Rolle spielen Toll-like-Rezeptoren als Oberflächenrezeptoren der DCs in atherosklerotischen Läsionen. Diese erkennen unter anderem Lipopolysaccharide, oxidiertes LDL Cholesterin und Hitzeschockproteine, wodurch Signalkaskaden des adaptiven und angeborenen Immunsystems in Gang gesetzt werden. Wie in peripheren Geweben migrieren aktivierte DCs in regionale Lymphknoten und präsentieren die Antigene T-Lymphozyten, wodurch eine adaptive Immunantwort ausgelöst wird. Die Aktivierung von T-Lymphozyten kann jedoch auch direkt in den Plaques erfolgen (Perrins und Bobryshev 2011). Dendritische Zellen, speziell mDCs, haben eine essentielle Bedeutung für den immunologischen Prozess in der Atherogenese. Sie werden durch Abbauprodukte aus nekrotischen Zellen, welche zahlreich in den atherosklerotischen Plaques vorkommen, aktiviert. Die Ausschüttung von Zytokinen bewirkt eine Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten (Asselin-Paturel und Trinchieri 2005, Perrins und Bobryshev 2011).

Ein möglicher Mechanismus, welcher für steigende Zahlen von DCs in atherosklerotischen Läsionen verantwortlich sein könnte, ist das vermehrte Eindringen der Zellen über das geschädigte Endothel aus der Blutbahn (Yilmaz et al. 2004). Eine weitere Hypothese ist, dass die Anreicherung von DCs in Plaques das Ergebnis einer verminderten Migration aus den Plaques in die regionalen Lymphknoten im Sinne eines "Trappings" ist (Randolph et al. 2008,

Van Vre et al. 2011). In konstruierten Arterien stimulieren aktivierte mDCs autologe CD4⁺ T-Lymphozyten IFN- γ zu produzieren, in die Gefäßwand einzuwandern und eine Inflammation auszulösen (Han et al. 2008). Jedoch zeigten einige Autoren im Gegensatz dazu, dass DCs auch antigenspezifische Toleranz in den peripheren T-Zellen auslösen können, um Autoimmunität zu verhindern (Hawiger et al. 2001, Kretschmer et al. 2005, Steinman und Nussenzweig 2002). Kretschmer et al. untersuchten in ihrer Arbeit, dass eine Konversion von CD4⁺ T-Lymphozyten in Tregs induziert durch DCs möglich sein könnte (Kretschmer et al. 2005).

2.2.3 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten entstammen hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, wo Progenitorzellen entstehen. Diese migrieren dann zum Thymus, werden dort selektioniert und entwickeln sich zu reifen T-Lymphozyten. Danach wandern sie aus dem Thymus aus und halten sich im Blut und in den Lymphknoten auf, wo sie eine zentrale Rolle in der erworbenen Immunantwort spielen (Legein et al. 2013). T-Lymphozyten sind an vielen immunologischen Prozessen wie der Abwehr von Viren, Bakterien, Mykobakterien oder Pilzen sowie autoimmunologischen und entzündlichen Vorgängen beteiligt. Es handelt sich bei T-Lymphozyten um spezielle Lymphozyten, welche antigenspezifische Immunantworten vermitteln. Sie können nach ihrem Phänotyp, also den exprimierten Oberflächenproteinen, eingeteilt werden sowie nach funktionellen Eigenschaften wie der Produktion von bestimmten Zytokinen, dem Einfluss auf B-Lymphozyten oder der Hypersensibilität. Die T-Lymphozyten werden meist nach Expression von T-Zell-Rezeptoren, welche aus einer α - und β -Einheit oder einer γ - und δ -Einheit bestehen, den Co-Rezeptoren CD4 und CD8 sowie dem auf allen T-Lymphozyten vorkommenden Marker CD3 charakterisiert. Diese Moleküle bilden zusammen den T-Zell-Rezeptor-Komplex, welcher bewirkt, dass T-Lymphozyten eine spezifische Immunantwort gegen ein durch MHC-Moleküle präsentiertes Antigen auslösen können. CD4⁺ T-Helfer-Zellen erkennen ein Antigen in Verbindung mit MHC II Molekülen auf einer antigenpräsentierenden Zelle, wogegen CD8⁺ zytotoxische T-Zellen ein Antigen in Verbindung mit MHC I Molekülen wahrnehmen. Die Signalkaskade, welche durch die Bindung von T-Zell-Rezeptor und MHC Komplex sowie die Reaktion von kostimulatorischen Faktoren der T-Lymphozyten und der antigenpräsentierenden Zellen ausgelöst wird, führt zu umfangreichen Reaktionen. Die Proliferation, Ausschüttung verschiedener Mediatoren und Zytokine und Expression bestimmter Oberflächenmoleküle werden initiiert (Ketelhuth und

Hansson 2011). Jonasson et al. wiesen 1986 erstmals T-Lymphozyten in humanen Plaques nach (Jonasson et al. 1986). Eine Untersuchung von fatty streaks bei Apo E defizienten Mäusen hat 1996 gezeigt, dass CD4⁺ Zellen häufig sowohl gruppiert als auch einzeln vorkommen. CD8⁺ Zellen fand man dagegen seltener (Zhou et al. 1996). Die meisten der CD4⁺ T-Helfer-Zellen scheinen Th1-Zellen zu sein (Jonasson et al. 1986). Diese produzieren das proatherogene Zytokin IFN γ sowie den proinflammatorischen TNF (Ketelhuth und Hansson 2011). Bereits 2000 beschrieben Whitman et al., dass Th1-getriggerte Immunantworten, speziell die Ausschüttung von IFN γ , eine proatherogene Wirkung aufweist (Mallat et al. 2009, Whitman et al. 2000). IFN γ scheint Monozyten, Makrophagen sowie DCs zu aktivieren, was wiederum zur Aufrechterhaltung der Th1-Antwort führt. Weiterhin kann dieses Zytokin die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie deren Produktion von kollagenen Fasern inhibieren und die Expression von Matrix-Metalloproteinasen steigern. Dies führt zu einer Reduktion der Dicke der fibrösen Kappe und somit zur Instabilität einer Plaque (Tedgui und Mallat 2006). Auch Th2-Zellen sowie entsprechende Zytokine wurden in atherosklerotischen Läsionen gefunden (Ketelhuth und Hansson 2011). Sie schütten IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 aus. Sie helfen B-Lymphozyten bei der Antikörperproduktion. Th2-Zellen wurden in atherosklerotischen Läsionen in geringer Zahl gefunden. Jedoch scheint ihre Induktion durch einen starken hyperlipidämischen Zustand begünstigt zu werden. Ob Th2-Zellen eher atheroprotektiv oder –fördernd wirken, wird kontrovers diskutiert. Einerseits wurde beschrieben, dass Th2-Zell Antworten die proatherogenen Th1-Zell Wirkungen antagonisieren, indem IL-4 und IL-5 hochreguliert und IFN γ herunterreguliert wird (Mallat et al. 2009). Auch Huber et al. zeigten, dass Th2-Zell Reaktionen im Mausmodell atheroprotektiv wirken und eine frühe fatty streak Entwicklung herabsetzen (Huber et al. 2001). Jedoch wurde z.B. in einer anderen Arbeit gezeigt, dass der Mangel an IL-4 keinen eindeutigen Effekt auf die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen hat (King et al. 2007). In einer vorhergehenden Studie desselben Autors wirkte ein Mangel an IL-4 dagegen antiatherogen, was wiederum bedeutet, dass das von den Th2-Zellen ausgeschüttete IL-4 die Atheroskleroseentwicklung fördert (King et al. 2002). Auch Davenport et al. haben gezeigt, dass ein Mangel an IL-4 im fortgeschrittenen Stadium die Plaqueentwicklung verhindert (Davenport und Tipping 2003). Die gebildeten Zytokine IL-5 und IL-33 haben dagegen antiatherogene Eigenschaften (Mallat et al. 2009). Die physiologische Rolle der CD8⁺ Zellen ist die Bekämpfung virusinfizierter Zellen sowie Tumorzellen, indem an MHC-I-gebundene Antigene erkannt werden. Der Einfluss von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten auf atherosklerotische Plaques ist nicht eindeutig erforscht (Ketelhuth und Hansson 2011). Der Mangel dieser Zellen in Apo E

defizienten Mäusen zeigte keinen deutlichen Einfluss auf die atherosklerotischen Läsionen. (Elhage et al. 2004). Olofsson et al. fanden jedoch, dass die Größe der Läsion und die Anzahl der CD8⁺ T-Lymphozyten parallel ansteigt, wenn eine Stimulation mit einem CD137 Antikörper erfolgt, welcher CD8⁺ T-Lymphozyten anregt (Olofsson et al. 2008). Dies ist ein Hinweis auf die proatherogene Funktion zytotoxischer T- Lymphozyten (Ketelhuth und Hansson 2011).

2.2.4 Regulatorische T-Lymphozyten (Tregs)

Die regulatorischen T-Lymphozyten (Tregs) sind eine Subspezies der T-Lymphozyten. Man unterscheidet natürliche CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs, welche im Thymus produziert werden, von induzierbaren Tregs, welche aus naiven CD4⁺ T-Lymphozyten unter dem Einfluss von DCs in der Peripherie entstehen. Natürliche im Thymus produzierte Tregs wandern in periphere Gewebe ein, um Immunantworten zu regulieren, z.B. wird die Selbsttoleranz unterstützt und Autoimmunerkrankungen somit verhindert. Induzierte Tregs hingegen entstehen in der Peripherie während einer aktiven Immunantwort (Chistiakov et al. 2013). Naive CD4⁺CD25⁻ Zellen können in der Peripherie unter anderem durch den Einfluss von TGF β und IL-10 in CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen konvertiert werden (Ketelhuth und Hansson 2011). Sowohl natürliche als auch induzierte Tregs spielen eine wichtige atheroprotektive Rolle (Taleb et al. 2010). CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs unterdrücken sowohl die Proliferation gewebespezifischer autoimmuner T-Lymphozyten, deren Umwandlung in Th1-, Th2- und Th17-Zelltypen, als auch die Aktivierung polyklonaler T-Lymphozyten. Sie supprimieren CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten sowie die Funktion anderer Immunzellen, wie B-Lymphozyten, Makrophagen, NK-Zellen, NKT-Zellen und DCs (Chistiakov et al. 2013, Sasaki et al. 2012). Dies erfolgt über verschiedene Mechanismen wie die Sekretion immunsuppressiver Mediatoren z.B. IL-10 und TGF β , Hemmung von IL-2, Zell-Zell-Kontakt abhängige Hemmung und funktionelle Modifikation oder die Induktion des Zelltods antigenpräsentierender Zellen (Sasaki et al. 2012). Das IL-2 spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Tregs und Effektor-T-Lymphozyten. Die Effektor-T-Lymphozyten schütten bei Aktivierung IL-2 aus, welches an den CD25 Rezeptor auf den Tregs binden kann. Dadurch können Treg-Funktionen aufrechterhalten und aktiviert werden. Unter anderem kann die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 aktiviert werden, welcher wichtig für die Entwicklung sowie Funktion der Tregs ist und wiederum die IL-2-Sekretion herabsetzen kann. Einmal aktiviert supprimieren Tregs Effektor-T-Lymphozyten. Sie können durch

Entzug von IL-2 sogar Apoptose bei aktivierten T-Lymphozyten induzieren (Ait-Oufella et al. 2009). Durch die Hemmung der Immunantwort durch aktivierte T-Lymphozyten wird die Atherosklerose verringert. Das Gleichgewicht zwischen Effektor-T-Zellen und Tregs bestimmt die Entwicklung der Atherosklerose (Chistiakov et al. 2013). Zudem können Tregs aktivierte Lymphozyten durch Ausschüttung von Zytokinen, wie IL-10, TGF β und IL-35, inhibieren. Diese Zytokine können auch DCs inaktivieren, welche dadurch die Fähigkeit verlieren, T-Lymphozyten zu aktivieren. IL-10 und TGF β vermindern proatherogene inflammatorische Antworten in atherosklerotischen Läsionen (Ait-Oufella et al. 2009). Eine wichtige Entdeckung in Bezug auf die Rolle von TGF β im Immunsystem war, dass TGF β -defiziente Mäuse multiple inflammatorische Erkrankungen entwickelten (Shull et al. 1992, Kulkarni und Karlsson 1993). Diese Reaktion war mit einer verstärkten Proliferation und Aktivierung von T-Lymphozyten assoziiert. Dieser Faktor inhibiert die Proliferation, Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten in Th1- und Th2-Zellen und führt zur Inhibition von Th1- und Th2-Signalwegen (Li et al. 2006, Ait-Oufella et al. 2009). Es wurde gezeigt, dass TGF β Tregs in der Peripherie unterstützt, indem es als kostimulatorischer Faktor für die Expression von FoxP3 wirkt und eine wichtige Rolle für deren suppressive Funktion spielt (Cobbold et al. 2004). Einige bisherige Studien zeigten, dass TGF β einen antiatherogenen Effekt in Apo E defizienten Mäusen hat. Es hemmt die Entwicklung der Atherosklerose und mindert die Vulnerabilität der Plaques, da es die Synthese von extrazellulärer Matrix fördert. TGF β wird von mehreren in atherosklerotischen Läsionen vorkommenden Zelltypen sezerniert. Tregs können sowohl die Quelle als auch die Zielzellen dieses Faktors sein (Ait-Oufella et al. 2009). Auch IL-10 spielt eine wichtige Rolle bei der Verhütung inflammatorischer Prozesse. Dieses Zytokin wird von Th2-Zellen und Tregs produziert. Es wirkt ebenfalls antiatherogen. Ein IL-10 Mangel in Mäusen, welche einer atherosklerosefördernden Diät unterzogen wurden, begünstigt frühe atherosklerotische Läsionen, da eine vermehrte Einwanderung inflammatorischer Zellen erfolgt und proinflammatorische Zytokine produziert werden (Caligiuri et al. 2003, Mallat et al. 1999, Pinderski Oslund et al. 1999). George et al. haben Tregs und IL-10 häufiger bei Patienten mit stabilen atherosklerotischen Plaques als bei Patienten mit rezidivierenden Myokardinfarkten nachgewiesen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Tregs und IL-10 eine Plaqueruptur verhindern (George et al. 2012). Tregs beeinflussen die Reifung, Aktivierung und Funktion der DCs. Es kann ein Zell-Zell-Kontakt zwischen Beiden aufgenommen werden. Tregs hemmen die antigenpräsentierende Funktion der DCs und können erfolgreich proinflammatorische Stimuli antigenpräsentierender DCs auf naive T-Lymphozyten

verhindern, indem sie an unreife DCs binden und Signalwege beeinflussen. Umgekehrt können auch DCs Tregs regulieren (Chistiakov et al. 2013). Weber et al. berichteten über eine proatherogene Subspezies von DCs, welche Tregs supprimieren können (Weber et al. 2011). Jedoch gibt es auch DC-Spezies, welche Tregs in atherosklerotischen Plaques induzieren können und somit atheroprotektiv wirken (Choi et al. 2011). Zum Beispiel können Tregs durch Zell-Zell-Kontakt von DCs mit naiven T-Lymphozyten und die Sekretion von Zytokinen wie TGF β und IL-10 induziert werden. Die Kommunikation von DCs und Tregs erfolgt auch über Chemokine und deren Rezeptoren. Auch auf diesem Weg können DCs Tregs induzieren und in inflammatorische Regionen wie atherosklerotische Läsionen rekrutieren. Ait-Oufella et al. haben gezeigt, dass natürliche CD4+CD25+Foxp3+ Tregs Atherosklerose in LDRD defizienten Mäusen inhibieren können (Ait-Oufella et al. 2006). Einen weiteren Hinweis für den atheroprotektiven Effekt von Tregs erbrachten Mor et al., indem sie zeigten, dass der Transfer von natürlichen CD4+CD25+Foxp3+ Tregs in Apo E defiziente Mäuse das Auftreten von Atherosklerose stark reduziert (Mor et al. 2007). Foks et al. berichteten, dass Tregs in frühen Stadien der Atherosklerose die Bildung neuer Plaques verhindern, in bereits existierenden Plaques reduzieren sie die Plaquegröße und begünstigen die Stabilität (Foks et al. 2011). Es wurde außerdem nachgewiesen, dass durch eine Depression peripherer Tregs die Größe und Vulnerabilität atherosklerotischer Plaques in Apo E-defizienten Mäusen gesteigert wurde (Ait-Oufella et al. 2006). Bei Patienten mit ACS sind die Zahl zirkulierender Tregs sowie ihre Funktion vermindert. Sie sind anfälliger für durch oxidiertes LDL Cholesterin ausgelöste Apoptose und ihre Fähigkeit, die Proliferation von T-Helfer-Zellen zu supprimieren, ist eingeschränkt (Mor et al. 2006). De Boer et al. haben in verschiedenen Stadien atherosklerotischer Plaques Tregs immunhistochemisch nachgewiesen. Sie wurden in allen Stadien in sehr geringer Zahl gefunden. In instabilen Plaques wurden im Vergleich zu initialen Plaques signifikant mehr Tregs nachgewiesen (de Boer et al. 2007a). Patel et al. untersuchten atherosklerotische Plaques von symptomatischen und asymptomatischen Patienten immunhistochemisch. Dabei wurden signifikant mehr FoxP3-positive Zellen in symptomatischen versus asymptomatischen Plaques gezeigt (Patel et al. 2010). Van Es et al. zeigten, dass eine Impfung mit FoxP3 zu einer Verminderung FoxP3-positiver Tregs führt und daraufhin initiale atherosklerotische Läsionen vermehrt auftraten. Dies ist ein weiterer Hinweis für die protektive Rolle von Tregs in Atherosklerose (van Es et al. 2010). Klingenberg et al. erklärten zudem in ihrer Arbeit, dass eine Unterdrückung der Tregs bei LDL-defizienten Mäusen einen enormen Anstieg der Atherosklerose verursacht, jedoch ohne eine entsprechende vaskuläre Entzündungsreaktion. Bei den Treg-defizienten

Mäusen waren ein Cholesterin-Anstieg im Plasma sowie ein verändertes atherogenes Lipoproteinprofil mit Anstieg des Very Low Density Lipoproteins zu verzeichnen. Es kam zu einer Anreicherung von cholesterinreichen Partikeln im Blutkreislauf. Die Expression von Proteinen und Enzymen, welche eine Rolle im Lipoproteinstoffwechsel spielen, wurden beeinflusst. Diese Ergebnisse sind Hinweise dafür, dass Tregs Atherosklerose vermindern, indem sie den Lipoproteinstoffwechsel modulieren (Klingenberg et al. 2013).

2.2.5 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind im Knochenmark gereifte Lymphozyten und sind in der Lage, bestimmte Zellen, wie z.B. Tumorzellen, zu lysieren. Diese Zellart ist verschieden von T- und B-Lymphozyten und ein wichtiger Teil der angeborenen Immunabwehr. Ihre primäre physiologische Funktion scheint eine frühe Abwehr von Pathogenen zu sein, während das adaptive Immunsystem aktiviert wird. NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Viren und der Bekämpfung von Tumorzellen. Sie agieren als Effektorzellen, indem zytoplasmatische Granula mit Perforinen und Granzymen ausgeschüttet werden oder durch die Produktion von Zytokinen, wie z.B. IFN. Dabei werden weitere Effektorzellen aktiviert. Eine Zellyse der Zielzellen beruht auf den durch Perforine gebildeten Poren in der Zellmembran der Zielzellen, durch welche Granzyme in die Zellen eintreten und sie abtöten. Auch-NK Zellen selbst können durch Zytokine aktiviert werden. Es gibt Hinweise darauf, dass sie auf die Entstehung von Atherosklerose Einfluss haben, spezielle Mechanismen sind aber noch nicht aufgeklärt. Eine direkte Evidenz für den Einfluss der NK-Zellen in der Entstehung gibt es kaum, jedoch wurden sie in humanen atherosklerotischen Plaques lokalisiert (Vanderlaan und Reardon 2005). Bei einer immunhistochemischen Analyse von Proben aus Autopsien wurden CD56+ NK-Zellen in der Intima initialer Läsionen gefunden. Allerdings war die Zellzahl gering und die Verteilung in der Läsion unregelmäßig, wobei mehr Zellen in den Plaqueschultern als im Lipidkern gefunden wurden (Millonig et al. 2002). Auch haben Patienten mit ausgeprägter Atherosklerose höhere Zellzahlen zirkulierender NK-Zellen (Vanderlaan und Reardon 2005). Eine weitere Studie zeigte, dass die Zytotoxizität der NK-Zellen bei älteren Patienten mit Atherosklerose abnimmt, aber die Gesamtzahl der zirkulierenden NK-Zellen erhöht ist (Bruunsgaard et al. 2001). Auf die Anlockung und Aktivierung von NK Zellen in Plaques haben unter anderem Chemokine wie MCP-1, CXCL1 und IL-15 Einfluss (Vanderlaan und Reardon 2005).

2.2.6 Chemokinrezeptoren

Chemokine sind Proteine, die eine essentielle Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten sowohl bei Homöostase als auch bei der Inflammation spielen. Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Transmembranproteine. Sie werden vorrangig von T-Lymphozyten und Monozyten bzw. Makrophagen exprimiert und ermöglichen die Migration bestimmter Zellen, auch Chemotaxis genannt. Die durch Chemokine aktivierten Signalwege sind komplex. Es können abhängig vom Rezeptor und beteiligtem Zelltyp Chemotaxis, Adhäsion, Proliferation oder Kontrolle von Genexpression ausgelöst werden (White et al. 2013). Die Liganden werden von verschiedenen Zellen, z.B. Endothelzellen oder DCs, exprimiert. Durch die Anziehung von dem Ligand und dem Rezeptor können entsprechende Zellen in die Zielbereiche rekrutiert werden (Zlotnik und Yoshie 2012). Der von uns untersuchte Rezeptor CCR4, der von T-Lymphozyten, insbesondere Th2-Lymphozyten und Tregs exprimiert wird, hat zwei Liganden (CCL17, CCL22) (Zlotnik und Yoshie 2012, Lee et al. 2005, White et al. 2013). CCR6 wird von zahlreichen Leukozyten wie unreifen DCs, T-Lymphozyten, v.a. Th17-Lymphozyten und Tregs, B-Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten exprimiert. Sein Ligand ist MIP3alpha (Wan und Murphy 2011, Zlotnik und Yoshie 2012). CCR6 reguliert v.a. die Migration von unreifen DCs und T-Lymphozyten während der Inflammation und immunologischen Prozessen in das Zielgewebe (Wan und Murphy 2011). Chemokinrezeptoren sind an der Atherogenese beteiligt. Im Bereich einer Plaque werden durch die Produktion von Chemokinen inflammatorische Zellen rekrutiert, was eine entscheidende Rolle in der Entstehung und im Progress der Atherome spielt (Patel et al. 2013). Ein Hinweis für die Bedeutung von Chemokinrezeptoren bei der Atherogenese ist z.B., dass Gu et al. im Tiermodell zeigten, dass durch das Fehlen von CCR2 die Plaquebildung inhibiert wurde und die Einwanderung von Makrophagen in die Gefäßwand vermindert war (Gu et al. 1998). Eine Studie von Potteaux et al. ergab, dass die Deletion von CCR1 im Knochenmark LDLR- Mäuse zu einem starken Progress der Plaquebildung in der Aorta thoracica bei fettreicher Ernährung führte (Potteaux et al. 2005). Die Entfernung des CCR7-Gens bei LDLR- Mäusen, die ebenfalls eine fettreiche Diät bekamen, ging mit einer verminderten Plaquegröße und verminderten Makrophagen- und DC-Zahl einher (Luchtefeld et al. 2010). Abd Alla et al. zeigten, dass das Ausschalten von CCR9 in hämatopoetischen Progenitorzellen ApoE defizienter Mäuse die Bildung atherosklerotischer Läsionen verzögerte, was ebenfalls aufzeigt, dass Chemokinrezeptoren in der Atherogenese von Bedeutung sind (Abd Alla et al. 2010).

2.3 Ziele und Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die Atherosklerose ist eine in den Industrienationen sehr häufige Erkrankung mittel- und großkalibriger Arterien, welche Ursache für u.a. Myokardinfarkt und Apoplex - die häufigsten Todesursachen der westlichen Welt - ist. Die Atherosklerose wird nicht länger als rein degenerativer Prozess, sondern als inflammatorische Erkrankung der Gefäßwand angesehen. In letzter Zeit wurden viele Studien durchgeführt, welche ergaben, dass pro- und antiinflammatorische Immunzellen sowie Mediatoren und ihre Rezeptoren eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielen.

Die Ziele der aktuellen Studie sind, das Vorkommen pro- und anti-inflammatorischer Zellen in verschiedenen Stadien atheroskleröser Plaques sowie die eventuelle Korrelation der Zellzahlen zu untersuchen, um die Interaktion der jeweiligen Zellen bei der Atherogenese zu analysieren. Auch die Verteilung dieser Zellen in den einzelnen Regionen der Läsionen wird dargestellt. Zudem ist es unser Ziel, die Aktivität der Immunzellen mittels Aktivierungsmarkern zu betrachten. Es erfolgt die Untersuchung, ob die Expression bestimmter Chemokinrezeptoren positiv mit dem Vorkommen verschiedener Immunzellen korreliert und somit eventuell eine chemotaktische Funktion bestehen könnte.

Auch die Erfassung der klinischen Daten der Patienten und die Betrachtung eines möglichen Einflusses verschiedener Risikofaktoren, Vorerkrankungen, Einnahme bestimmter Medikamente sowie Vorliegen ischämischer Symptome auf die zelluläre Komposition ist ein zentraler Punkt dieser Arbeit.

Das Ziel unserer Untersuchung sind Rückschlüsse auf den Einfluss immunologischer Prozesse und spezieller Zellen, Faktoren und klinischer Daten auf die Stabilität bzw. Morphologie atherosklerotischer Plaques.

3. Material und Methoden

3.1 Gewinnung humaner Präparate der Arteria carotis interna

Das Ziel der durchgeführten immunhistochemischen Färbungen war es, inflammatorische Zellen und ihre Rezeptoren in atherosklerotischen Plaques zu detektieren und zu quantifizieren. Es wurden insgesamt 29 Plaques (12 Femoralis-, 17 Carotisplaques) und 12 Carotisarterien als Kontrollgewebe untersucht. Die Plaques wurden mit dem Verfahren der Thrombendarteriektomie gewonnen (Abb. 4 A, Abb. 4 B).

Zur Indikation der Carotis-Thrombendarteriektomie lässt sich Folgendes sagen. Bei asymptomatischen Stenosen der A.carotis interna wird ein chirurgisches Vorgehen bei Stenosen von 60-99% empfohlen, da in diesem Bereich durch eine Thrombendarteriektomie das Apoplexrisiko signifikant reduziert wird (Eckstein et al. 2012). Der therapeutische Nutzen besteht bei der Operation einer asymptomatischen Stenose, wenn das geschätzte Komplikationsrisiko <3% und die Lebenserwartung des Patienten über 5 Jahre liegt. Bei einer symptomatischen Stenose, d.h. nach Auftreten einer Transitorisch ischämischen Attacke oder eines nicht behindernden Apoplex wird bei einer Stenose von 70-99% so früh wie möglich eine Thrombendarteriektomie der A.carotis interna empfohlen. Auch bei einem Stenosegrad von 50-69% wird dieses Vorgehen in Erwägung gezogen. Neurologisch stabile Patienten, bei denen ein sekundärprophylaktischer Nutzen zu erwarten ist, können auch bei behinderndem Apoplex von einer Carotis-Thrombendarteriektomie profitieren. Die geschätzte perioperative Komplikationsrate sollte <6% sein (Eckstein et al. 2012).

Im Falle einer Stenose oder eines Verschlusses der Oberschenkelarterie ist eine chirurgische Maßnahme nur bei erheblicher Einschränkung der Gehstrecke und hohem Leidensdruck indiziert. Im Stadium III und IV nach Fontaine (Stadium 4-6 nach Rutherford) ist die Indikation jedoch absolut, im Stadium II (Stadium 1-3 nach Rutherford) relativ (Balzer und Rümenapf 2008, Hirsch et al. 2006). Eine Stentimplantation ist bei Iliaca communis-Läsionen indiziert. Darüber hinaus gibt es keine klare Empfehlung, wann welcher Stent wo appliziert werden soll. Die Implantation in gelenküberschreitende Gefäßsegmente ist jedoch meist nicht indiziert. Bei u.a. bilateralen Verschlüssen der A.iliaca communis, langstreckigen Stenosen der femoro-iliakalen Strohmahn, aortoiliakalen oder bilateralen Verschlüssen, multiplen Stenosen, ist die Anlage eines femoro-poplitealen Bypasses indiziert. Die Technik der Thrombendarteriektomie sollte für segmentale oder längersteckige Verschlüsse der A. femoralis superficialis und Femoralisgabel genutzt werden. Das operative Verfahren der

ersten Wahl ist die Thrombendarteriektomie bei isoliertem Befall der A. femoralis communis (Balzer und Rümenapf 2008).

Die gefäßchirurgischen Abteilungen der Universitätsklinik Jena sowie der Thüringen-Klinik Georgius Agricola Saalfeld haben mit dem Einverständnis der Patienten, welche über das Ziel und den Verlauf der wissenschaftlichen Arbeit schriftlich und mündlich aufgeklärt wurden, die Proben sowie die klinischen Daten zur Verfügung gestellt. Präoperativ wurden die Patienten nach klinischen Symptomen wie einer Transitorisch ischämische Attacke, einem prolongierten reversiblen ischämischen neurologischen Defizit, einem Schlaganfall, Schwindel, Synkopen und Einschränkung der Gehstrecke befragt. Patienten mit systemisch inflammatorischen Erkrankungen und metastasierten Tumorleiden wurden ausgeschlossen. Der Grad der Stenose des betroffenen Gefäßes wurde mittels Duplexsonographie, Magnetresonanztomographie, computertomographischer Angiographie oder digitaler Subtraktionsangiographie festgestellt. Zahlreiche klinische Daten wurden dokumentiert und ausgewertet. Als Kontrolle dienten Gefäßproben von Patienten der rechtsmedizinischen Abteilung der Universitätsklinik Jena, welche anonymisiert zur Verfügung standen. Es handelte sich hierbei meist um Unfall- oder Suizidopfer. Ansonsten galten für diese die gleichen Ausschlusskriterien wie oben aufgeführt.

Die Einteilung der Plaques erfolgte nach histologischen Kriterien mit Hilfe der Trichromfärbung zur Darstellung der verschiedenen Regionen der Plaques sowie einer immunhistochemischen Färbung mit CD34 zum Nachweis von Neovaskularisation.

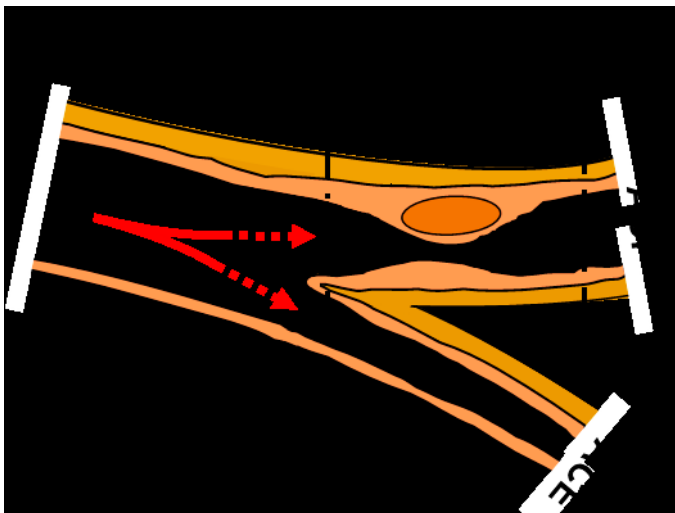


Abb. 4 A: Schema der Plaquegewinnung aus der Arteria carotis interna (Yilmaz et al. 2007)

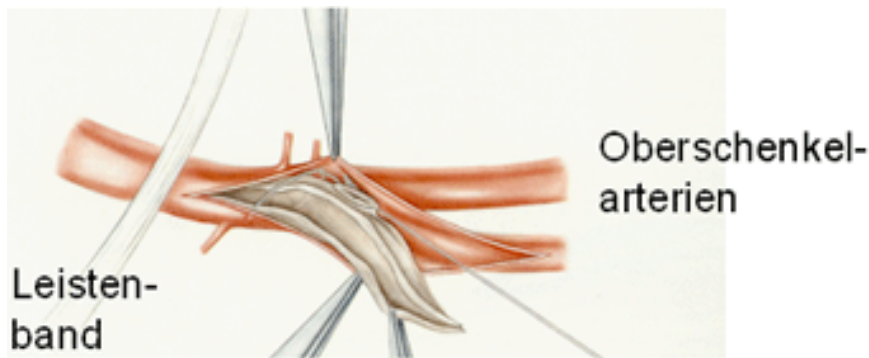


Abb. 4 B: Schema der Plaquegewinnung aus der Arteria femoralis (Förster)

3.2 Aufarbeitung des Materials

Reagenzien und Geräte für die Aufarbeitung

- 1) 4%-ige Formaldehydlösung
- 2) Der genutzte EDTA-Puffer zur Entkalkung wurde aus 201g EDTA, welches in 900ml Aqua dest. gelöst wurde, hergestellt. Die Einstellung des pH-Wertes von 7,5 erfolgte durch langsames Zugabe von Natriumhydroxid Plätzchen.
- 3) Einbettkassetten (Rotilab, Roth)
- 4) Histokinette (Leica TP1020) mit entsprechenden Reagenzien (siehe Tab. 3)
- 5) Paraffinausgießstation (Leica EG1160)
- 6) Rotationsmikrotom (Leica) mit speziellen Klingen (Feather Microtome Blade)
- 7) Objektträger (Thermo Scientific Menzel Gläser Superfrost plus)
- 8) Wasserbad (Leica)
- 9) Wärmeschrank (Heraeus)

Ablauf

Nach Entnahme wurden die Plaques und Kontrollgefäße 24-72 Stunden in 4%-iger Formaldehydlösung bei 4°C fixiert. Diese Maßnahme diente der Verhinderung von Autolyse und der Konservierung des Gewebes. Um eine Vernetzung, Denaturierung und Maskierung der Antigene zu vermeiden, wurde die Formalinlösung nach 24-72 Stunden entfernt. Dies diente der Verbesserung der Färbequalität. Anschließend erfolgte der Ausschluss makroskopisch stark beschädigter Präparate. Danach wurden die Proben vier Wochen in einen EDTA-Puffer zur Entkalkung gegeben, welcher wöchentlich gewechselt wurde. Dadurch fand das Herauslösen von Calciumcarbonat- und Hydrogencarbonatverbindungen aus den Plaques statt. Nach erfolgter vierwöchiger Entkalkung wurden die Präparate mit einem Skalpell in

etwa 5 mm dicke Querschnitte zerteilt. Je nach Größe der entnommenen Plaques und Kontrollgefäße entstanden so 1-10 Teilstücke. Jedes dieser Teilstücke wurde in eine Einbettkassette (Rotilab, Roth) gelegt und 30 Minuten in Leitungswasser gespült. Zur Entwässerung wurden die gefüllten Kassetten in eine Histokinette (Leica TP1020) gegeben. Die Proben durchliefen die aufsteigende Alkoholreihe, Xylol- und Paraffinstationen insgesamt 12 Stunden. Die Inkubationszeiten sind in Tabelle 3 dargestellt. Dies ist notwendig, damit das Paraffin im nächsten Schritt in das Gewebe eindringen kann. Als nächstes wurden die Probenstücke in Formen gegeben, welche in einer Paraffinausgießstation (Leica EG1160) mit 60°C heißem Paraffin ausgegossen wurden. Auf der Kühlplatte des Geräts wurden die Blöcke einige Minuten gekühlt, bis man sie aus den Formen entnehmen konnte. Aus den fest gewordenen Paraffinblöcken konnten am Rotationsmikrotom (Leica) mit speziellen Klingen (Feather Microtome Blade) nach dem Abtrimmen der obersten Schicht 4 µm dicke Schnitte der Plaques und Kontrollgefäße hergestellt werden. Die dünnen Schichten wurden in ein 40°C warmes Wasserbad gegeben und nach erfolgter Entfaltung auf Objektträger (Thermo Scientific Menzel Gläser Superfrost plus) übertragen.

Zur Fixierung der Schnitte erfolgte die Aufbewahrung in einem Wärmeschrank bei 60°C für 12 Stunden. Nach der Fixierung mussten die Objektträger für eine Stunde abkühlen.

| Medium | Zeit |
|-------------------------------|-------------|
| 70% Ethanol | 60 min |
| 70% Ethanol | 60 min |
| 96% Ethanol | 60 min |
| 96% Ethanol | 60 min |
| 100% Ethanol | 60 min |
| 100% Ethanol | 60 min |
| 100% Ethanol | 60 min |
| 1:1 100% Ethanol + 100% Xylol | 60 min |
| 100% Xylol | 60 min |
| 100% Xylol | 60 min |
| Paraffin | 60 min |
| Paraffin | 60 min |

Tab. 3: Ablauf der Behandlung in der Histokinette

3.3 Histologische und immunhistochemische Färbungen

3.3.1 Trichromfärbung nach Masson

Zunächst erfolgte die Trichromfärbung, um die einzelnen Regionen wie Plaqueschultern, die fibröse Kappe, den Lipidkern, die Media und die kontralaterale Seite darzustellen. Dies diente auch der Einteilung in stabile und instabile Plaques. Die Zellkerne stellten sich bei dieser Färbung schwarz dar, das Zytoplasma ziegelrot, die Muskelfasern rot, das Bindegewebe grün und die Erythrozyten orange.

Reagenzien für die Trichromfärbung

- Roti-Histol, Alkoholreihe zum Entparaffinieren
- 100%-iger, 96%-iger, 70%-iger Ethanol
- Eisenhämatoxylin nach Weigert (VWR Merck, #1.15973.0002)
- Aqua dest.
- 25% HCl
- Leitungswasser
- Azophloxin (Chroma, #1B-103)
- 100% Essigsäure
- Phosphormolybdänsäure-Hydrat (VWR Merck, 1.00532.0025)
- Orange G (Chroma, #1A-116)
- Lichtgrün-SF gelblich (VWR Merck, 1.15942.0025)
- Shandon EZ Mount (Thermo Fischer, #9999120)

Ansetzen der Reagenzien

Für die Herstellung der Eisenhämatoxylinlösung nach Weigert wurden 100 ml Weigerts Lösung A und 100 ml Weigerts Lösung B gemischt.

Zum Erhalt von 1 l HCl-Alkohol werden 24 ml 25%-ige HCl in 976 ml 70%-igen Ethanol gegeben und die Lösung gut gemischt.

Die Azophloxinlösung wurde durch Lösen von 1 g Azophloxin in 200 ml Aqua dest. und Hinzufügen von 0,4 ml Essigsäure zubereitet.

Bei der Zubereitung von Phosphormolybdänsäure-Orange G Lösung erfolgt die Lösung von 8 g Phosphormolybdänsäure-Hydrat und 4 g Orange G in 200 ml Aqua dest.

Die Lichtgrün-Lösung wurde hergestellt, indem 0,4 g Lichtgrün in 200 ml Aqua dest. gelöst wurden. Anschließend musste 0,4 ml Essigsäure zugesetzt werden.

Das Eindeckmedium Shandon EZ-Mount wurde für den Gebrauch 1:1 mit Xylol verdünnt.

Durchführung der Trichromfärbung

Die Reagenzien wurden bei Raumtemperatur verwendet. Die Schritte wurden in Dako Küvetten unter einem Abzug durchgeführt.

- (1) Durch das Durchlaufen der absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte entparaffinisiert. Es erfolgte die Inkubation 2x für 15 min mit Roti-Histol, anschließend 2x für 5 min mit 100% Ethanol, 3 min mit 96% Ethanol und 3 min mit 70% Ethanol. Danach wurden die Schnitte in Leitungswasser gegeben.



- (2) Daraufhin wurden sie für 6 min in Eisenhämatoxylin nach Weigert getaucht.



- (3) Als nächstes erfolgte eine einminütige Spülung in Aqua dest.



- (4) Im vierten Schritt wurden die Präparate kurz in HCl-Alkohol eingetaucht.



- (5) Dann wurden alle Objektträger 3-5 min in Leitungswasser gespült.



- (6) Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 15 min mit Azophloxin-Lösung.



- (7) Daraufhin wurden die Schnitte kurz in 1%-ige Essigsäure-Lösung getaucht.



- (8) Für 3 min wurden die Präparate in Phosphormolybdänsäure-Orange G Lösung gegeben.
⇓
- (9) Erneut wurden die Schnitte kurz in 1%-ige Essigsäure-Lösung getaucht.
⇓
- (10) Anschließend wurden sie für 4 min mit Lichtgrün-Lösung inkubiert.
⇓
- (11) Wieder erfolgte das kurze Tauchen in 1%-ige Essigsäure-Lösung.
⇓
- (12) Anschließend durchliefen die Proben die aufsteigende Alkoholreihe (1x3 min 70% Ethanol, 1x3 min 96% Ethanol, 2x5 min 100% Ethanol, 2x15 min Roti-Histol).
⇓
- (13) Abschließend erfolgte das Eindeckeln mit Shandon EZ-Mount und die Trocknung der Präparate.

3.3.2 Immunhistochemie

Das Ziel der immunhistochemischen Färbungen war vorrangig die Untersuchung der Plaques und des Kontrollgewebes durch Markierung mit entsprechenden Antikörpern auf das Vorkommen von Zellen und Faktoren, die an Immunprozessen beteiligt sind.

Vorbereitung der Präparate

Nach der Fixierung mussten die Objektträger für 1 Stunde abkühlen. Daraufhin wurden sie zur Entparaffinisierung und Rehydrierung für 2x15 min in Xylol und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe (2x5 min 100% Ethanol, 3 min 96% Ethanol, 3 min 70% Ethanol) gegeben. Als nächstes erfolgte ein fünfminütiges Waschen in Tris-Puffer. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte zur Antigendemaskierung in einer mit Citrat-Puffer, bzw. bei CD34 und FoxP3 Färbungen mit EDTA-Puffer, gefüllten Dako-Küvette in einer Mikrowelle 3x5 min erhitzt. Nach einer Abkühlphase von 30 min wurden die abgekühlten Objektträger abgeklopft und die Querschnitte der Plaques bzw. des gesunden Gewebes bei den immunhistochemischen Färbungen mit einem Stift (Dako-Pen) umkreist, um das Abfließen der nachfolgend aufgetropften Substanzen zu verhindern.

Als nächstes wurden die immunhistochemischen Färbungen durchgeführt. Diese wurden alle nach dem Färbeschema des Dako Catalyzed Signal Amplification-Systems durchgeführt. Es wurde für alle immunhistochemischen Färbungen der Catalyzed Signal Amplifikation-System Kit von Dako (Dako North America Inc., 6392 Via Real, Carpinteria, CA 93013 USA) genutzt.

Im Folgenden werden die Antikörper dargestellt, welche in der vorliegenden Arbeit bei den immunhistochemischen Färbungen verwendet wurden. Bezeichnungen, Klone, Hersteller und Verdünnungen der verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Verwendete T-Zell-Marker

CD3:

CD3 ist ein Transmembrankomplex, welcher an den T-Zell-Rezeptor gebunden ist, somit auf allen T-Lymphozyten vorhanden ist, und zur Aktivierung von T-Lymphozyten beiträgt, indem eine intrazelluläre Signalkaskade gestartet wird. Dieses Molekül spielt somit eine Rolle bei der spezifischen Immunantwort.

CD4:

CD4 ist ebenfalls ein Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors, welcher jedoch mit MHC Klasse 2 Molekülen interagiert und auf der Zellmembran von Thymozyten und T-Helfer-Zellen nachgewiesen wurde.

CD8:

CD8 ist ein hauptsächlich von zytotoxischen T-Lymphozyten und Suppressor-T-Lymphozyten exprimierter Co-Rezeptor, welcher im Zusammenspiel mit dem T-Zell-Rezeptor mit MHC Klasse 1 Molekülen interagiert.

CD25:

Es handelt sich bei diesem Transmembranprotein um die alpha-Kette des IL2-Rezeptors. CD25 wird auf aktivierten T- und B-Lymphozyten, Thymozyten und regulatorische T-Zellen exprimiert.

FoxP3:

FoxP3 ist ein von regulatorischen T-Lymphozyten exprimierter Transkriptionsfaktor, welcher als zentraler Regulator sowie spezifischer Marker fungiert. Es ist der aktuell verlässlichste Treg-Marker (Sasaki et al. 2012).

Verwendete Marker für DCs**Fascin:**

Fascin ist ein Actin-Bündelungsprotein, welches in den Membranausstülpungen von mDCs vorkommt und eine Rolle bei der Migration dieser spielt. Ein Einfluss auf das Zytoskelett wird angenommen (Yamashiro et al. 1998). Das Fascin wurde als globaler Marker für myeloide DCs verwendet.

S100:

S100 ist ein Calcium bindendes Protein, welches in DCs, Monozyten sowie Neutrophilen Granulozyten exprimiert wird. Die Funktion dieses Proteins spielt eine Rolle beim Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und bei inflammatorischen Prozessen. Es markiert außerdem Gliazellen und Ependymzellen, Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems sowie Melanozytentumoren. Das S-100 wurde als globaler Marker für myeloide DCs verwendet.

CD209:

CD209 ist ein Transmembranprotein, welches spezifisch für mDCs ist. Als Adhäsionsmolekül beeinflusst es die Migration von DCs aus der Blutstrombahn ins Gewebe. Darüber hinaus ist CD209 ein Rezeptor für bestimmte Pathogene u.a. HIV1. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung und Internalisierung dieser Erreger (Granelli-Piperno et al. 2005). Das CD209 wurde als Marker für unreife myeloide DCs verwendet.

CD83:

Bei diesem Molekül handelt es sich um ein Glycoprotein der Ig-Superfamilie, welches ein Marker für reife mDCs ist. Es spielt eine Rolle bei der Antigenpräsentation (Zhou et al. 1992).

CD161:

Humanes CD161 ist ein Transmembranglycoprotein, welches spezifisch für NK-Zellen ist. Dieses Molekül ist bei der Aktivierung dieser Zellen beteiligt.

HLA-DR:

Dieses Oberflächenmolekül gehört zu den MHC Klasse 2 Rezeptoren und ist auf verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen zu finden, wie z.B. DCs, B-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten. Sie interagieren mit T-Zell-Rezeptoren und sind an der Antigenpräsentation beteiligt, was über weitere Wege zur B-Lymphozyten Aktivierung führt.

Verwendete Endothelzellmarker**CD34:**

Dieses Antigen wird auf der Oberfläche hämatopoetischer Stammzellen exprimiert. Es lässt sich ebenfalls auf Kapillarendothelzellen darstellen und ist somit hinweisend auf das Vorkommen von Neovaskularisation, die ansonsten im histologischen Präparat manchmal schwer zu erkennen ist.

Chemokinrezeptoren**CCR4:**

Chemokinrezeptoren spielen eine Rolle in Chemotaxis, Einwanderung, Entwicklung und Funktion der Immunzellen. Bei CCR4 handelt es sich um einen Chemokinrezeptor, welcher von DCs, T- Lymphozyten, B- Lymphozyten, Basophilen, Monozyten und NK-Zellen exprimiert wird und an der Einwanderung bestimmter Immunzellen in entzündliche Gewebe beteiligt ist (Lee et al. 2005). Liganden dieses Rezeptors sind RANTES, MCP1 und MIP3alpha.

CCR6:

CCR6 ist ein Chemokinrezeptor, welcher von unreifen DCs, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten exprimiert wird. Auch humane T-Lymphozyten, welche IL17 produzieren, exprimieren CCR6. Dieser Rezeptor ist an der Regulation der Migration von DCs und T-Lymphozyten bei inflammatorischen Vorgängen beteiligt (Lee et al. 2005). Es wird angenommen, dass CCR6 an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist, indem unter anderem

eine Einwanderung von Th17-Lymphozyten in das Zielgewebe erfolgt (Singh et al. 2008). Ein Ligand dieses Rezeptors ist MIP3alpha.

Reagenzien und Geräte für die immunhistochemische Färbung

1) Citratpuffer: (pH 6):

- 1800 ml Aqua dest. vorlegen
- 4,2 g Zitronensäure (Firma Sigma, Nr. C-0759) hinzugeben
- pH-Wert 6,0 mit 2-molarer Natriumhydroxidlösung einstellen
- Lösung mit Aqua dest. auf 2 l auffüllen

2) EDTA-Puffer zur Antigendemaskierung (pH 9):

- 900 ml Aqua dest. vorlegen
- 12,1 g Tris und 3,7 g EDTA hinzugeben
- pH-Wert 9 mit Natriumhydroxid. Einstellen
- mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen
- zur Verwendung Verdünnung 1:10 mit Aqua dest.

3) 10-fach Tris-Puffer (pH 7,4):

- 121 g Tris und 180 g NaCl abwiegen
- in 1800 ml Aqua dest. lösen
- mit 37%-iger rauchender HCl pH-Wert einstellen
- Auffüllen mit Aqua dest. auf 2 l

4) TBST-Puffer (pH 7,4):

- ein Teil Tris-Puffer 10-fach mit 9 Teilen Aqua dest. verdünnen
- auf 1 l Lösung 1 ml Tween20 hinzugeben
- mit elektrischem Magnetrührer 5-10 min rühren

5) Primärantikörper

| Antikörper | Klon | Hersteller | VD | Spezifität |
|------------|------------|-----------------|-------|--|
| CD3 | BW264/56 | Miltenyi Biotec | 1:100 | T-Lymphozyten |
| CD4 | 4B12 | Dako | 1:50 | T-Helfer-Lymphozyten |
| CD8 | C8/144B | Dako | 1:200 | Zytotoxische T-Lymphozyten |
| CD25 | CD25-3G10 | Invitrogen | 1:20 | Aktivierte B-Zellen, T-Lymphozyten, Thymozyten, regulatorische T-Lymphozyten |
| FoxP3 | 206D | Bio Legend | 1:20 | Regulatorische T-Lymphozyten |
| Fascin | 55K-2 | Dako | 1:100 | Myeloide DCs |
| S100 | polyklonal | Dako | 1:500 | Myeloide DCs, Monozyten, Neutrophilen |
| CD209 | DCN46 | BD Pharmingen | 1:100 | Unreife myeloide DC |
| CD83 | HB15e | Serotec | 1:40 | reife Formen von interdigitierenden Zellen, vaskulären DCs, Langerhanszellen |
| CD161 | B199.2 | Serotec | 1:20 | Natürliche Killerzellen |
| HLA-DR | TAL.1B5 | DakoCytomation | 1:25 | Antigen präsentierende Zellen |
| CD34 | QBEnd-10 | Dako | 1:50 | Kapillarendothelien |
| CCR4 | TG6/CCR4 | BioLegend | 1:50 | Chemokinrezeptor, Expression auf DCs, T- Lymphozyten, B-Lymphozyten, Basophile Granulozyten, Monozyten, Killerzellen |
| CCR6 | TG7/CCR6 | Bio Legend | 1:100 | Chemokinrezeptor, Expression auf reifen DCs, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten |

Tab. 4: Primärantikörper, verwendet für die immunhistochemischen Färbungen

6) Dako® Catalysed Signal Amplifikation System, Peroxidase:

Reagenzien des Kits:

1. Peroxidase Block: 3% Wasserstoffperoxid in Wasser
2. Protein Block Serum free
3. Biotinylated Link Antibody als Sekundärantikörper
4. Streptavidin-Biotin Complex, Reagenz A
Streptavidin-Biotin Complex, Reagenz B
Streptavidin-Biotin Complex, Diluent (Puffer)
Der Streptavidin-Biotin Complex wurde mindestens 30 min vor Gebrauch angesetzt werden. 1 ml Puffer wurde mit 40 µl Reagenz A und 40 µl Reagenz B gut vermischt.
5. Amplification Reagent: Biotinyltyramide und Wasserstoffperoxid
6. Streptavidin-Peroxidase: an Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin
7. Substratabletten, DAB Chromogen (DAB= 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid)
Substrat, Tris Puffer Konzentrat
Substrate, Wasserstoffperoxid
Bei der Herstellung des Chromogen-Substratkomplexes wurden die Substratabletten auf Raumtemperatur gebracht. Es wurden 400 µl des Tris-Pufferkonzentrats in ein kalibriertes 10 ml Röhrchen gegeben und auf 10 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Mit der Pinzette wurde eine Tablette hinzugegeben und die Lösung gut gemischt. Es erfolgt die Gabe von 2 ml des Chromogen Substrat Komplexes in einen Substrat Container und das Hinzufügen von 40 µl Wasserstoffperoxid (Substrate Hydrogen Peroxide). Diese Mixtur wurde ebenfalls gut gemischt.
8. Für den Antikörper S100 wurde aufgrund der Spezifität der Sekundärantikörper Polyklonal Swine Anti-rabbit E0431 Dako verwendet. Dieser wurde vor Gebrauch 1:4000 mit Antibody Diluent verdünnt.

Prinzip und Ablauf der immunhistochemischen Färbung

1. Prinzip

Der verwendete Färbekit, das Catalyzed Signal Amplification-System, ist ein sehr sensibles Verfahren, welches eine Signalamplifikation beinhaltet und somit auch sehr kleine Antigenmengen zuverlässig nachweist. Verglichen mit konventionellen Streptavidinbiotinmethoden wurde eine 50-fach höhere Sensitivität nachgewiesen.

Das gesuchte Antigen wird mittels eines spezifischen Antikörpers markiert. Anschließend erfolgt die darauf folgende Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper, die Inkubation mit Streptavidin-Biotin-Komplex mit Peroxidase als Reporterenzym und die Signalamplifikation durch die Inkubation mit entsprechendem Reagenz. Zuvor angelagertes Biotin reagiert mit dem Streptavidin der Streptavidin-Peroxidase und führt zu einer Umsetzung des Diaminobenzidintetrahydrochlorid, welches durch die Inkubation mit Chromogensubstrat hinzugefügt wird. Dadurch wird eine Braunfärbung des Präparats an der Antigenstelle bewirkt.

Bei den durchgeführten Färbungen wurde stets eine Positivkontrolle mitgeführt. Dafür wurden alle Schritte äquivalent an immunologischem Gewebe wie humaner Milz oder humanem Lymphknoten durchgeführt. Dieses Gewebe wurde anonymisiert von der rechtsmedizinischen Abteilung der Universitätsklinik Jena bereitgestellt. Zur Negativkontrolle wurde auf einen Plaquequerschnitt statt des Primärantikörpers Antibody Diluent aufgetropft, um eine unspezifische Anfärbung und Artefakte auszuschließen. Das Kontrollgewebe wurde nach dem gleichen Protokoll wie die Gefäße gefärbt. Das Ziel der Färbung der Kontrollen war die Verbesserung der Qualität und der Aussagekraft der Färbung.

2. Ablauf

Alle Schritte des Dako Catalyzed Signal Amplification-System erfolgten in der feuchten Kammer

- (1) Als erstes wurde das Deparaffinisieren und Rehydrieren (Kap. 3.3.2) durchgeführt.



- (2) Daraufhin folgte eine Antigendemaskierung mit Citratpuffer (Kap. 3.3.2).



- (3) Die Präparate kühlten 30 min ab (Kap. 3.3.2).

- ⇓
- (4) Danach wurden alle Schnitte mit dem Dako Pen umkreist.
- ⇓
- (5) Die Präparate wurden mit Hydrogen Peroxidase 5 min inkubiert, mit TBST gewaschen und gut abgeklopft.
- ⇓
- (6) Als nächstes erfolgte die Inkubation mit Protein Block für 5 min. Das Reagenz wurde gut abgeklopft.
- ⇓
- (7) Mit Primärantikörper bzw. Verdünnungslösung wurden die Schnitte im Falle der Negativkontrolle 15 min inkubiert, gewaschen mit TBST und gut abgeklopft.
- ⇓
- (8) Anschließend wurden sie mit Sekundärantikörper 15 min inkubiert, gewaschen mit TBST und gut abklopft.
- ⇓
- (9) Die Inkubation mit Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex erfolgte für 15 min. Danach wurden die Schnitte gewaschen mit TBST und gut abgeklopft.
- ⇓
- (10) Die Verstärkungsreaktion wurde durch Inkubation für 15 min mit Amplifikationslösung durchgeführt. Auch hiernach erfolgte das Waschen mit TBST und gutes Abklopfen.
- ⇓
- (11) Die Schnitte wurden mit Streptavidin-Peroxidase für 15 min inkubiert, gewaschen mit TBST und gut abgeklopft.
- ⇓
- (12) Bei der Chromogen-Substrat-Reaktion erfolgte nach Ausfällen des braunen Präzipitats das Blocken der Reaktion mit Aqua dest.
- ⇓
- (13) Zum Schluss wurde das Gewebe mit Aquatex® (Merck) eingedeckt und ein Deckglas (Thermo scientific Menzel Gläser) auf das Präparat gesetzt.

3.4. Einteilung der atherosklerotischen Plaques

Die einzelnen Regionen der Plaques wurden histologisch identifiziert. Folgende 6 Regionen wurden unterschieden: Fibröse Kappe, zwei Plaqueschultern, Lipidkern, Media und kontralaterale Seite (Abb. 5). Es erfolgte, um die Zellzahl zwischen stabilen und instabilen Plaques sowie Kontrollgefäßen zu vergleichen, eine Einteilung der Gewebe in entsprechende Untergruppen. Die Einteilung der Präparate zu den Gruppen stabile versus instabile Plaques erfolgte anhand histologischer Kriterien. Dafür wurden die Trichrom-Färbung (Abb. 6) sowie die CD34-Färbung (Abb. 7) zur Darstellung der Neovaskularisation durchgeführt. Zunächst wurde bei mit der Trichrom-Färbung nach Masson gefärbten Schnitten die fibröse Kappe, der Lipidkern und der gesamten Plaque vermessen (Abb. 6). Entsprechend erfolgte die Einteilung in die Gruppe der instabilen Atherome nach folgenden histologischen Kriterien:

1. Dicke der fibrösen Kappe unter 100 µm
2. Verhältnis von Lipidkern zu Gesamtplaque von über 50%
3. Nachweis einer deutlichen Neovaskularisation (Abb. 7)

Wurde eins dieser Kriterien erfüllt, erfolgte die Klassifizierung als "instabiler Plaque". Waren alle drei Kriterien nicht erfüllt, so wurde die Plaque der Gruppe der stabilen Plaques zugeteilt.

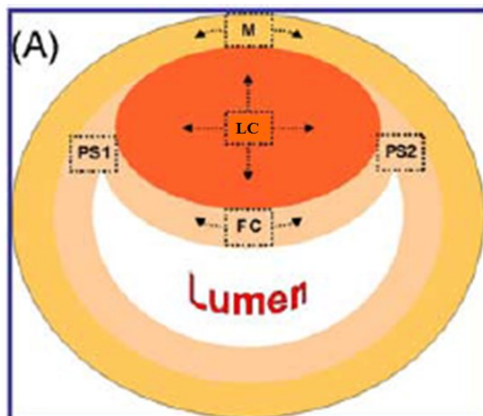


Abb. 5: Einteilung der einzelnen Regionen der Plaque, FC-Fibröse Kappe, PS-Plaqueschulter, LC-Lipidkern, M-Media, CL-Kontralaterale Seite (Yilmaz et al. 2004)

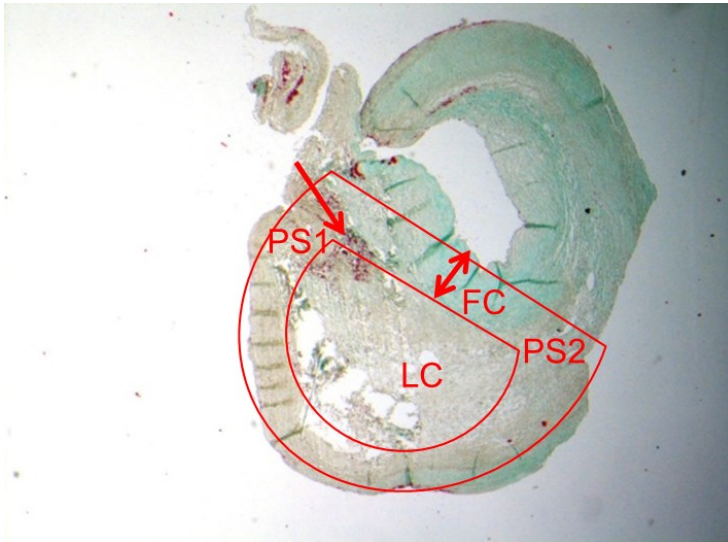


Abb. 6: Trichrom-Färbung einer instabilen Plaque zur Bestimmung der Regionen der Plaque, der Plaqueschulter, der Größe des Lipidkerns und der Dicke der fibrösen Kappe , 20x

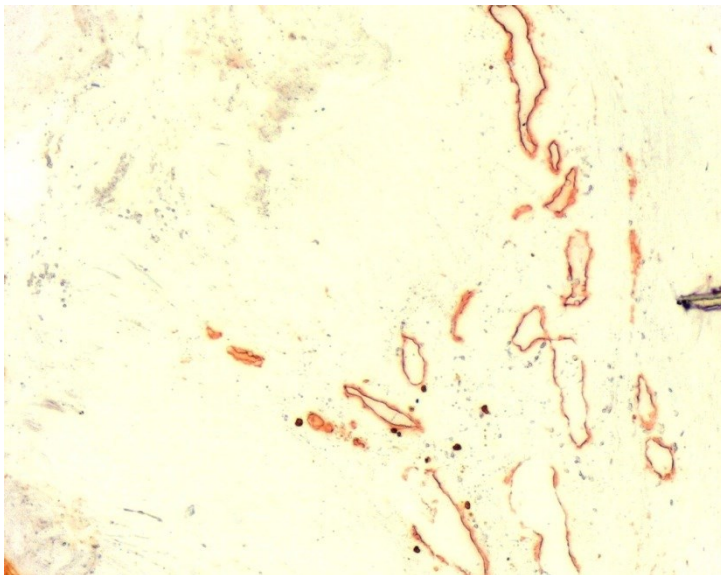


Abb. 7: CD34-Färbung einer instabilen Plaque mit deutlich sichtbarer Neovaskularisation, 100x

3.5 Digitale Quantifizierung immunhistochemisch gefärbter Zellen

Die digitale Quantifizierung der angefärbten Zellen erfolgte mittels Mikroskop (Zeiss, Axioplan 2 imaging), der Kamera (Zeiss, Axicam HRC) und des Bildverarbeitungsprogramms Axiovision. Mit einer 100-fachen Vergrößerung entstanden digitale Fotos der Plaqueregionen: Plaqueschultern, Lipidkern, fibröse Kappe, Media und der kontralateralen Seite. So entstanden mindestens sechs Bilder pro Präparat. Bei den Kontrollgefäßen wurde jeweils ein Foto von der Media und von der Intima angefertigt. Weiterhin wurden aus diesen Bereichen mittels des Bildanalyseprogramms Image J

repräsentative Bezirke von $0,1 \text{ mm}^2$ eingegrenzt. Auf diesen erfolgte die digitale Quantifizierung der spezifisch angefärbten Zellen. Diese entsprachen einer definierten Größe und minimalen Farbintensität. Kleine Artefakte wurden mithilfe einer Bildverbesserungsfunktion eliminiert. Größere Artefakte wurden manuell herausgerechnet. Die Analyse des Programms wurde stets visuell kontrolliert, bei Unsicherheiten manuell überprüft und verbessert. Die Quantifizierung wurde ausnahmslos von einer Person durchgeführt, um untersucherabhängige Unterschiede zu vermeiden.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit der Software SigmaPlot 12.0 durchgeführt. Der Vergleich von zwei Gruppen erfolgte mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney Rank Sum Tests. Ein p-Wert von unter 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Die Korrelationsanalysen erfolgten mittels Spearman Rank Order Test.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden 15 instabile, 14 stabile und 12 Kontrollgefäße immunhistochemisch auf das Vorhandensein verschiedener Immunzellen sowie funktioneller Immunmarker untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen.

4.1 Vorhandensein von Immunzellen in stabilen, instabilen Plaques und Kontrollgewebe

4.1.1 Monozyten/Makrophagen

Die Monozyten bzw. Makrophagen als bekannte antigenpräsentierende Zellen wurden mit Hilfe des Markers CD68 identifiziert (Abb. 8). Die genannten Zellen wurden signifikant 3,2-fach häufiger in stabilen Plaques als in Kontrollgewebe ($p < 0,001$) und auch signifikant 4,2-fach häufiger in instabilen Plaques im Vergleich zum Kontrollgewebe gefunden (Abb. 9, $p < 0,01$). Es wurden mehr CD68+ Zellen in instabilen Plaques als in stabilen Plaques nachgewiesen.

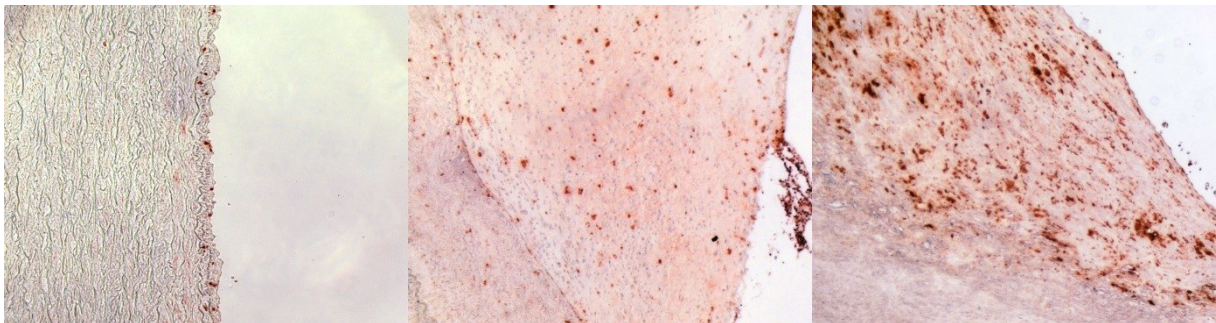


Abb. 8: Immunhistochemische Darstellung von CD68+ Makrophagen/Monozyten. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x

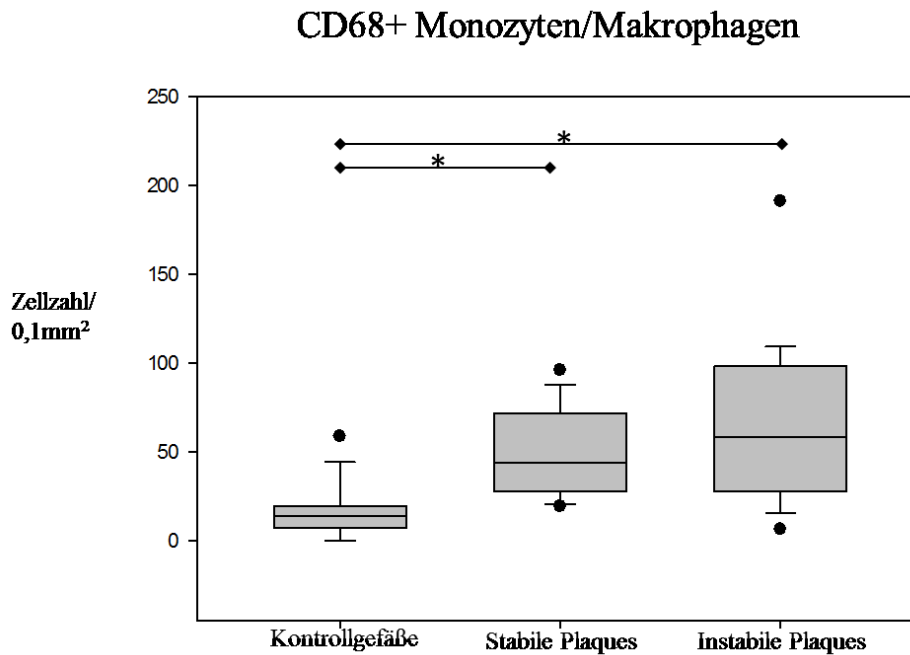


Abb. 9: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD68+ Monozyten/Makrophagen. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05

4.1.2 Dendritischen Zellen

Myeloide DCs wurden mittels verschiedener immunhistochemischer Marker analysiert. Um die Gesamtheit von mDCs aller verschiedenen Reifegrade zu erfassen, wurden die globalen Marker Fascin und S100 genutzt (Abb. 10, Abb. 12). Die Expression von Fascin wurde signifikant 1,6-fach stärker in instabilen Plaques gezeigt als in stabilen (p=0,03) sowie 1,9-fach häufiger im Vergleich zu Kontrollgewebe (Abb. 11, p=0,01). Zusätzlich wurde gezeigt, dass sich in stabilen Plaques mehr Fascin+ Zellen befinden als im Kontrollgewebe (Abb. 11).

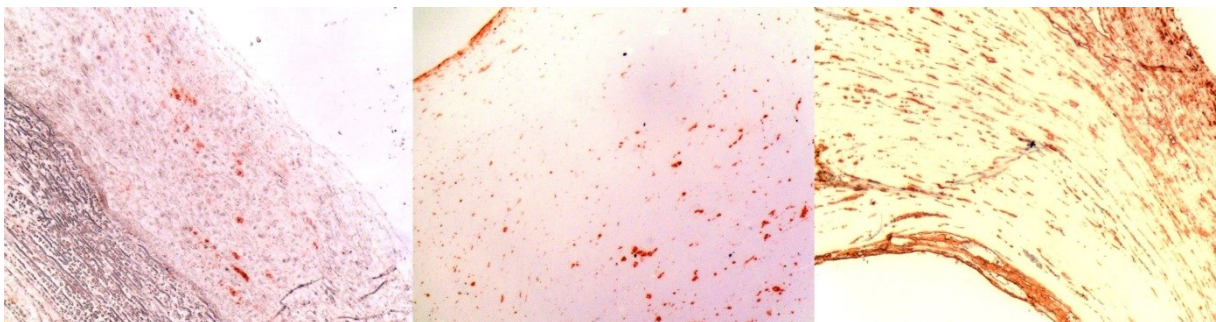


Abb. 10: Immunhistochemische Darstellung von Fascin+ mDCs. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x

Fascin+ Myeloide dendritische Zellen

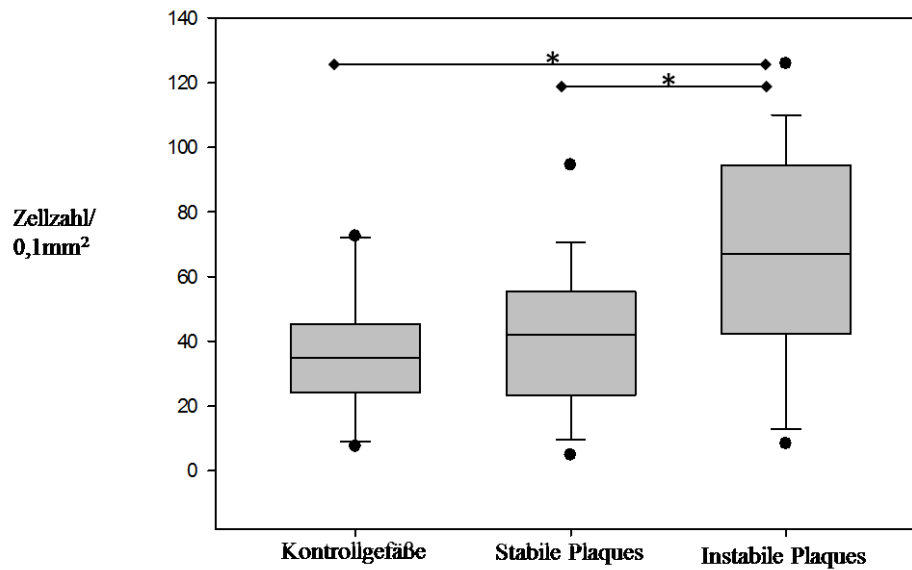


Abb. 11: Statistische Auswertung des Vorkommens von Fascin+ mDCs. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05

Auch S100+ Zellen wurden signifikant 1,6-fach zahlreicher in instabilen als in stabilen Plaques quantifiziert (Abb. 12, 13, p=0,014). Instabile Plaques wiesen höhere S100+ Zellzahlen auf als Kontrollgewebe (Abb. 13). Diese Ergebnisse zeigen kongruent, dass die Zahl an mDCs im Verlauf der Atherosklerose zunimmt mit den höchsten Werten in instabilen Plaques.

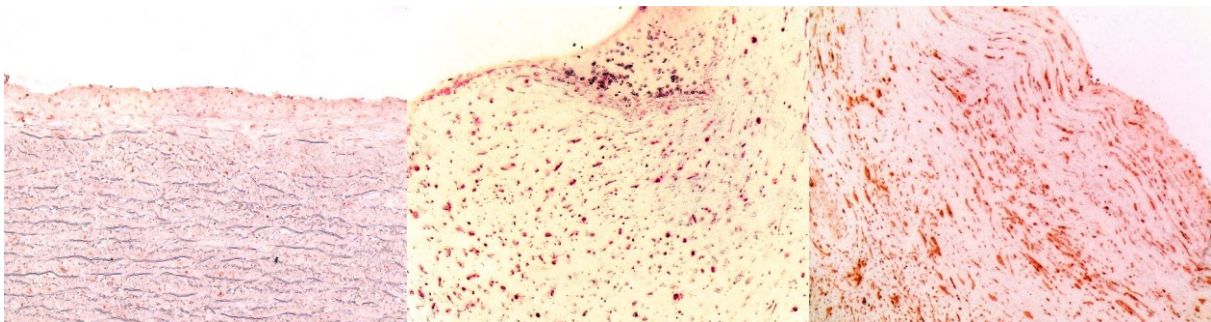


Abb. 12: Immunhistochemische Darstellung von S100+ mDCs. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x

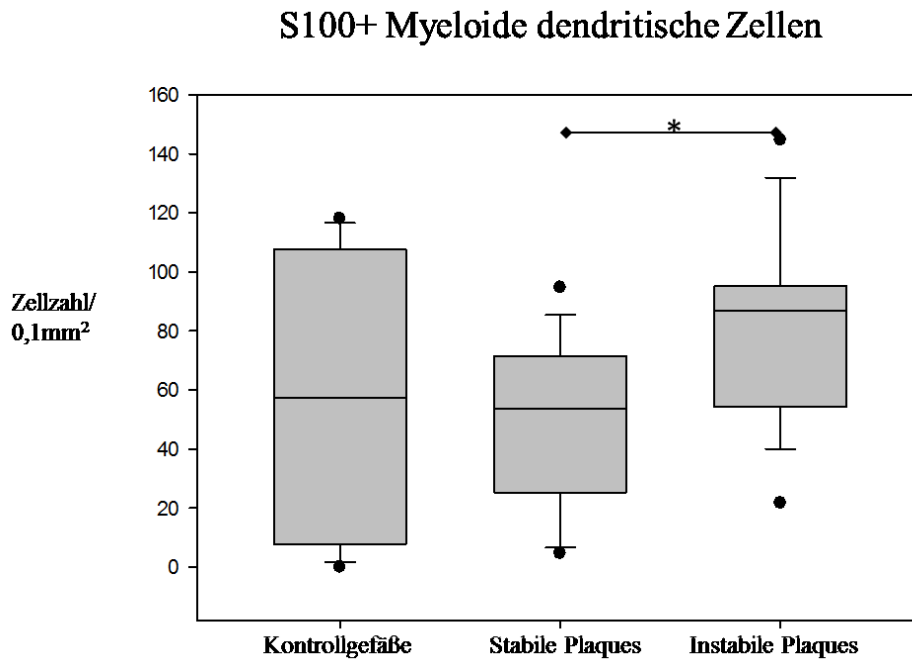


Abb. 13: Statistische Auswertung des Vorkommens von S100+ mDCs. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05

Um den Reifegrad der in den verschiedenen Plaquestadien dominierenden mDCs zu differenzieren, wurden immunhistochemische Färbungen mit CD83, einem nur auf reifen mDCs exprimierten Marker, und CD209, einem auf unreifen mDCs exprimierten Marker, durchgeführt (Abb. 14, 16). Es wurde die Expression von CD83+ reifen mDCs signifikant 5,8-fach zahlreicher in instabilen als in stabilen atherosklerotischen Plaques (p=0,003) sowie 9,7-fach erhöht gegenüber Kontrollgewebe (p=0,004) nachgewiesen (Abb. 15). Stabile Plaques wiesen 1,6-fach mehr CD83+ Zellen als Kontrollgewebe auf (Abb. 15).

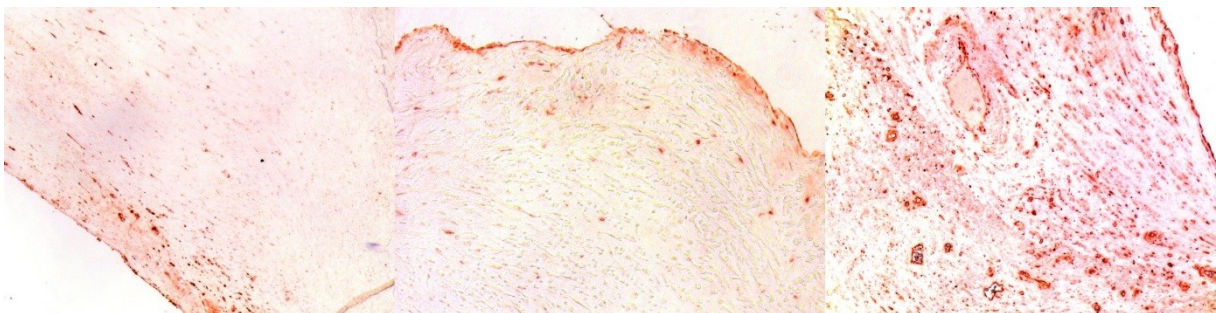


Abb. 14: Immunhistochemische Darstellung von CD83+ reifen mDCs. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x

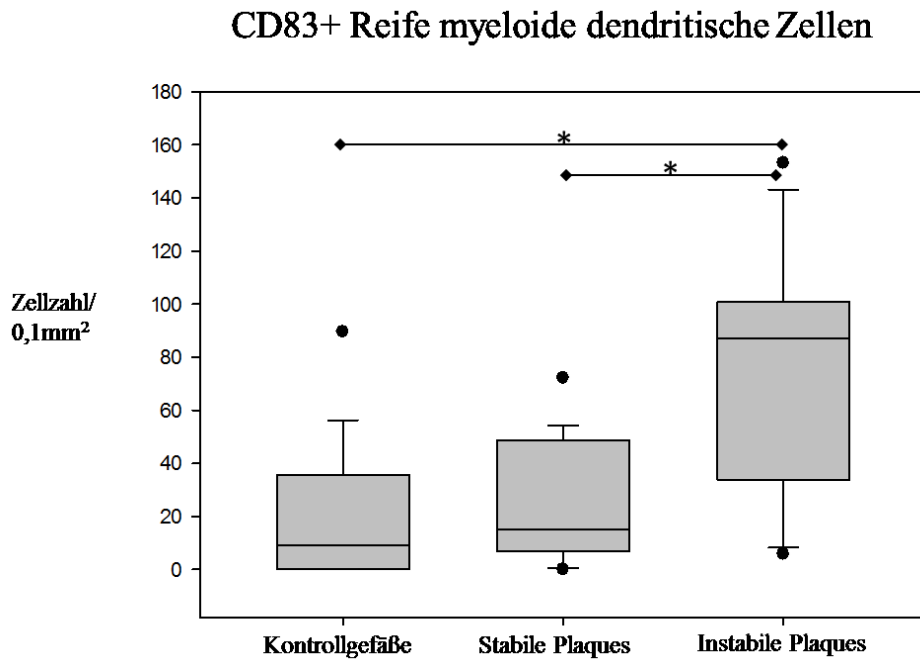


Abb. 15: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD83+ mDCs. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05

Das Vorkommen von CD209+ DCs ist signifikant 2,5-fach höher in instabilen Plaques als in stabilen Plaques (p=0,004) und auch 3,1-fach höher als in Kontrollgewebe (p=0,01). Dabei ist der Wert der stabilen Plaques höher als der Kontrollgewebe (Abb. 16, 17). Diese Ergebnisse zeigen, dass die globale Zahl der mDCs bei Zunahme der Instabilität der atherosklerotischen Läsionen zunimmt, während der Anstieg der reifen mDCs mehr als doppelt so groß wie der Anstieg der unreifen mDCs ist, was auf einen zunehmenden Reifungsgrad von mDCs in instabilen Plaques schließen lässt.

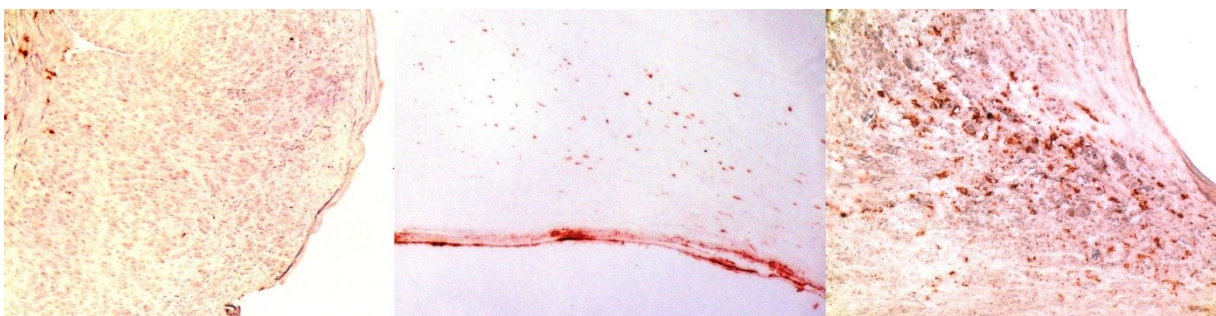


Abb. 16: Immunhistochemische Darstellung von CD209+ unreifen mDCs. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x

CD209+ Unreife myeloide dendritische Zellen

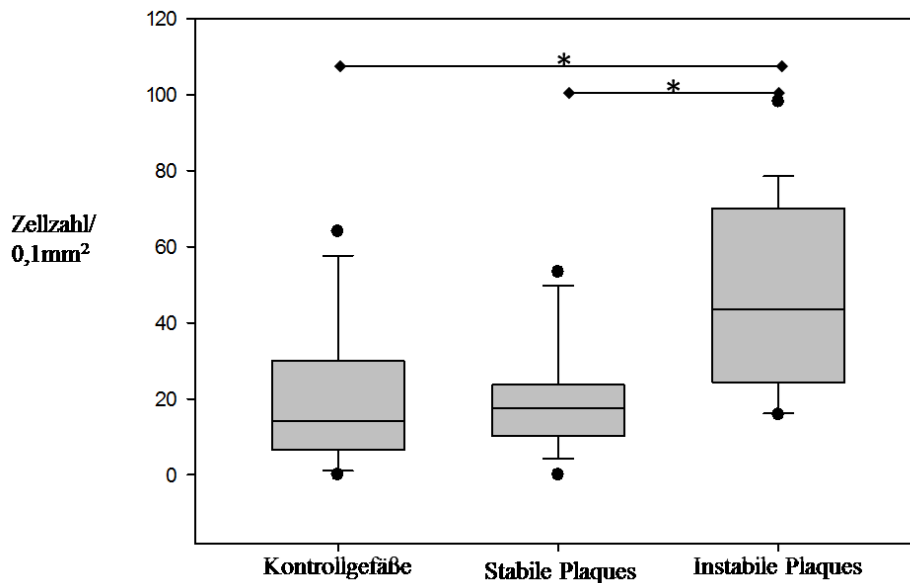


Abb. 17: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD209+ mDCs. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05

Für die von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) exprimierten Marker CD123 und CD304 wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen instabilen, stabilen Plaques und Kontrollgewebe nachgewiesen (Abb. 18, 19, 20, 21).

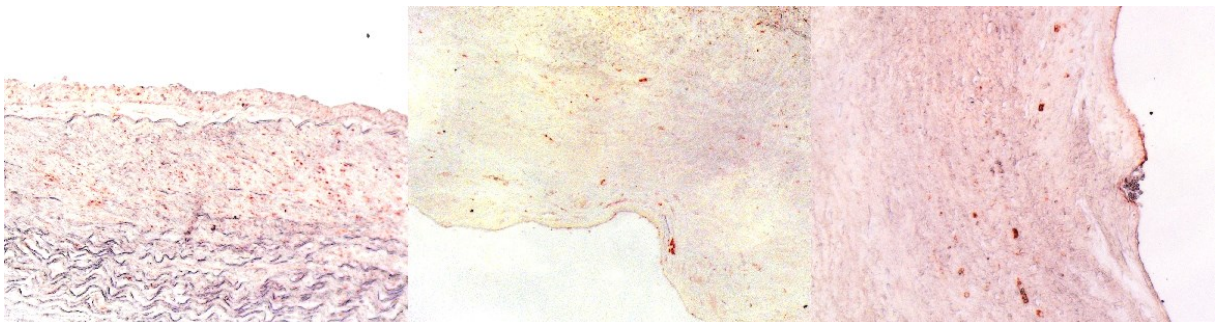


Abb. 18: Immunhistochemische Darstellung von CD123+ pDCs. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x

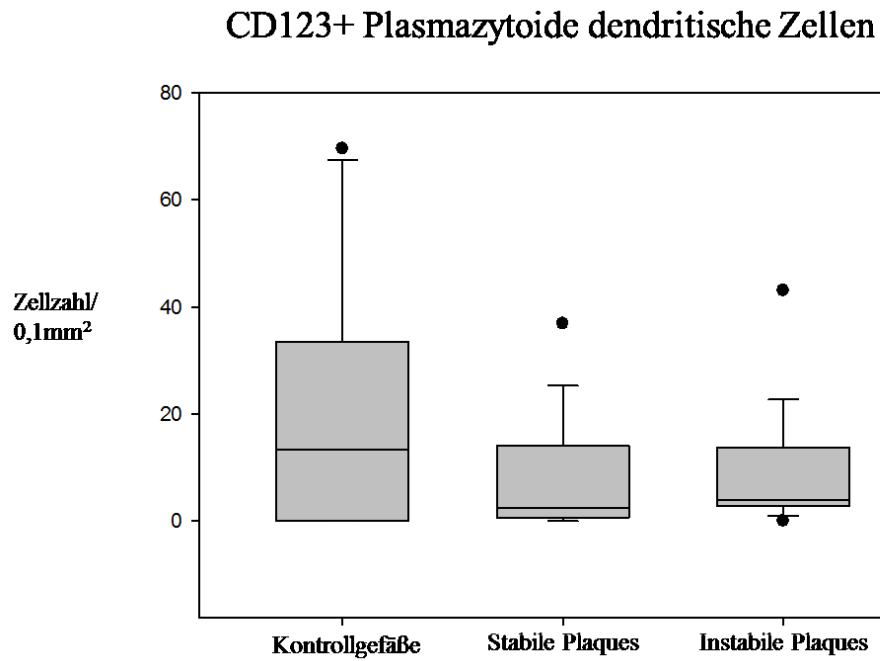


Abb. 19: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD123+ pDCs. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques.

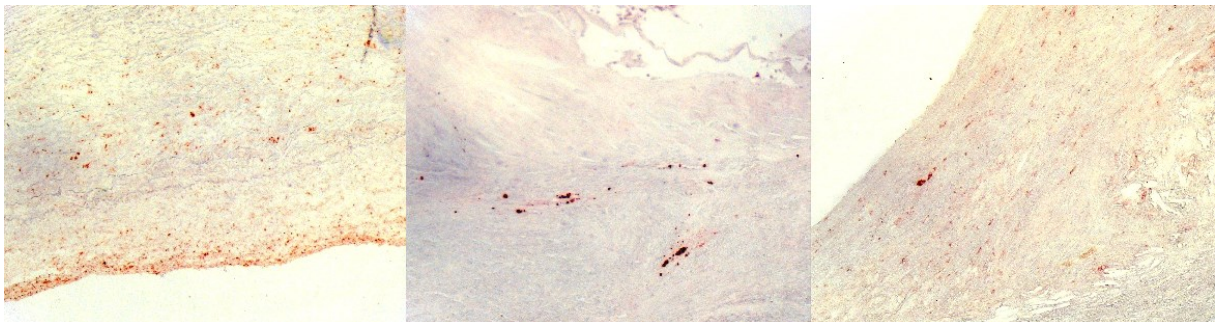


Abb. 20: Immunhistochemische Darstellung von CD304+ pDCs. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x

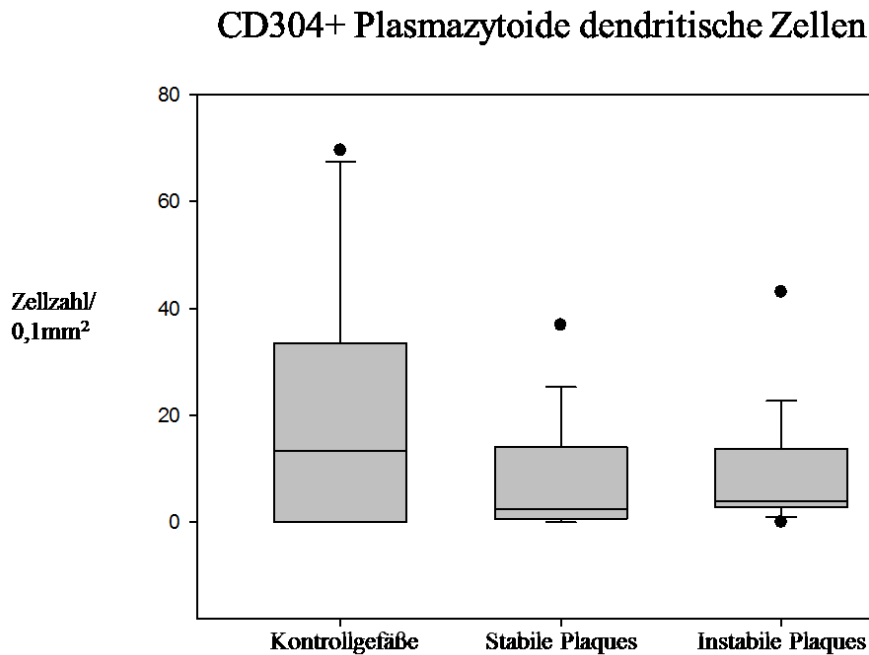


Abb. 21: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD304+ pDCs. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques.

Neben den bisher aufgeführten Oberflächenmarkern, die das Vorkommen von antigenpräsentierenden Zellen (APC) sowie im speziellen DCs nachwiesen, wurde auch das Vorkommen von HLA-DR als Aktivierungsmarker von APC im Plaque im Vergleich zum gesunden Gefäß betrachtet (Abb. 22). HLA-DR+ APC wurden signifikant 1,6-fach zahlreicher in instabilen Plaques nachgewiesen als in stabilen Plaques ($p=0,026$) sowie signifikant häufiger (2,4-fach) im Vergleich zu Kontrollgewebe (Abb. 24, $p=0,007$). Es wurde gezeigt, dass stabile Plaques höhere Zellzahlen HLA-DR+ APCs als Kontrollgewebe aufwiesen (Abb. 23).

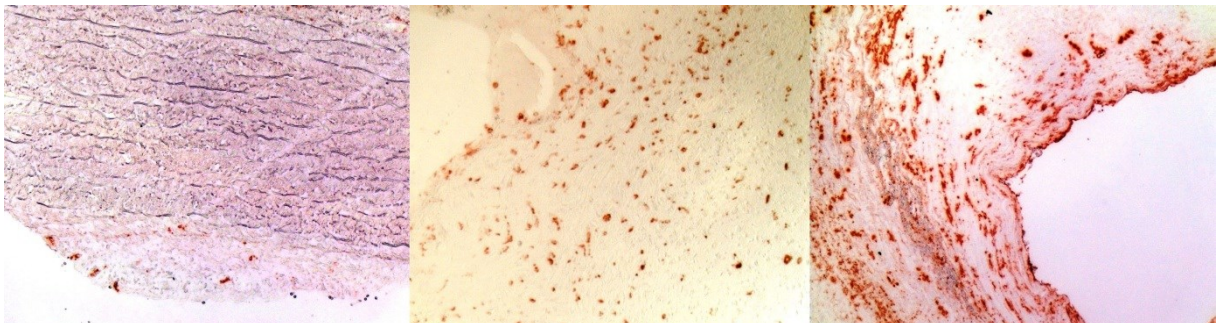


Abb. 22: Immunhistochemische Darstellung von HLA-DR+ APC. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x

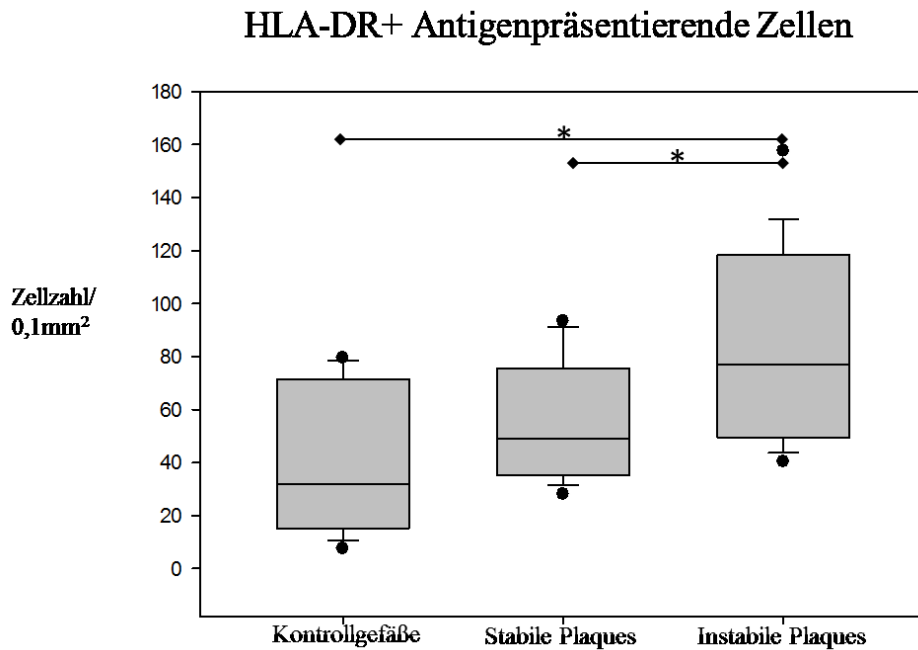


Abb. 23: Statistische Auswertung des Vorkommens von HLA-DR⁺ APC. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05

4.1.3 T-Lymphozyten

Mithilfe des Oberflächenantigens CD3 wurden alle Formen von T-Lymphozyten in den unterschiedlichen Stadien der Plaques detektiert (Abb. 24). Die Expression von T-Lymphozyten, welche mithilfe des Markers CD3 quantifiziert wurden, wurde signifikant 2,3-fach stärker in instabilen Plaques nachgewiesen als in stabilen Plaques ($p < 0,001$) sowie 4,5-fach im Vergleich zu Kontrollgewebe (Abb. 25; $p = 0,002$). Zudem ist aufgefallen, dass in stabilen Plaques mehr CD3⁺ Zellen als in Kontrollgewebe zu finden sind (Abb. 24, 25).

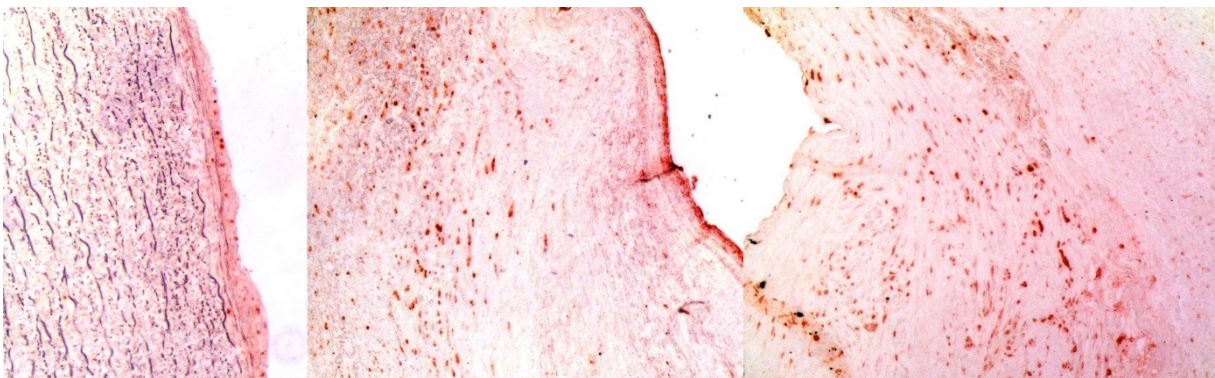


Abb. 24: Immunhistochemische Darstellung von CD3⁺ T-Lymphozyten. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x

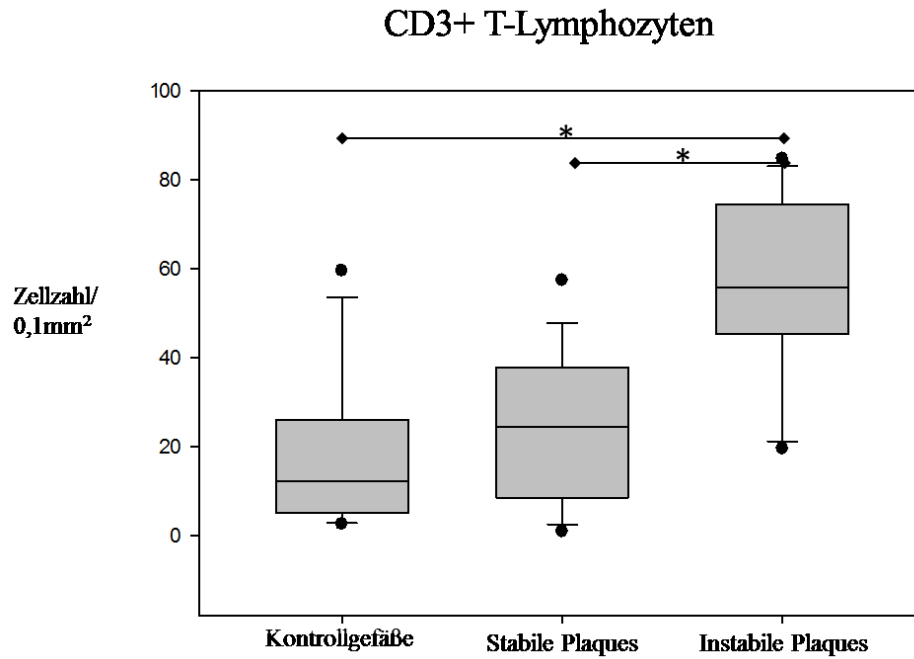


Abb. 25: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD3+ T-Lymphozyten. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05

CD4+ T-Helfer-Zellen kamen signifikant 3,4-fach zahlreicher in instabilen Plaques vor als in stabilen Plaques (p=0,008). Die Zellzahl in instabilen Plaques war auch höher als in Kontrollgewebe (Abb. 26, 27).

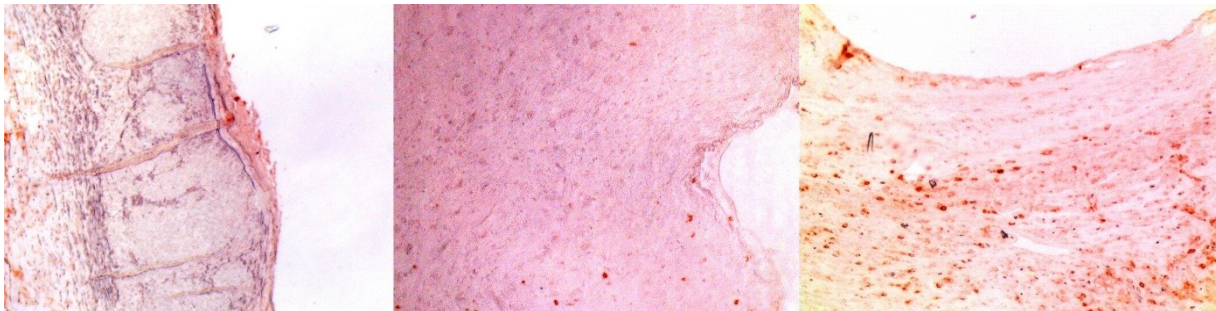


Abb. 26: Immunhistochemische Darstellung von CD4+ T-Helfer-Zellen. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x

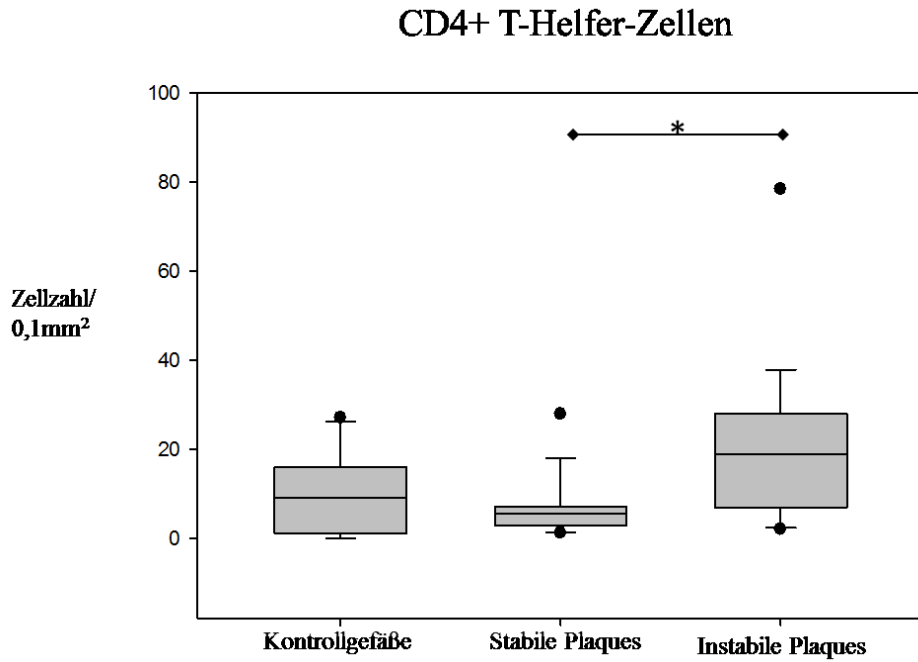


Abb. 27: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD4+ T-Helfer-Zellen. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05

Betrachtet man die CD8+ zytotoxischen T-Zellen, so waren auch diese signifikant 3,4-fach zahlreicher in instabilen Plaques als in stabilen Plaques vertreten (p=0,001) sowie 5,1-fach erhöht im Vergleich zu Kontrollgewebe (Abb. 28, 29; p=0,001).

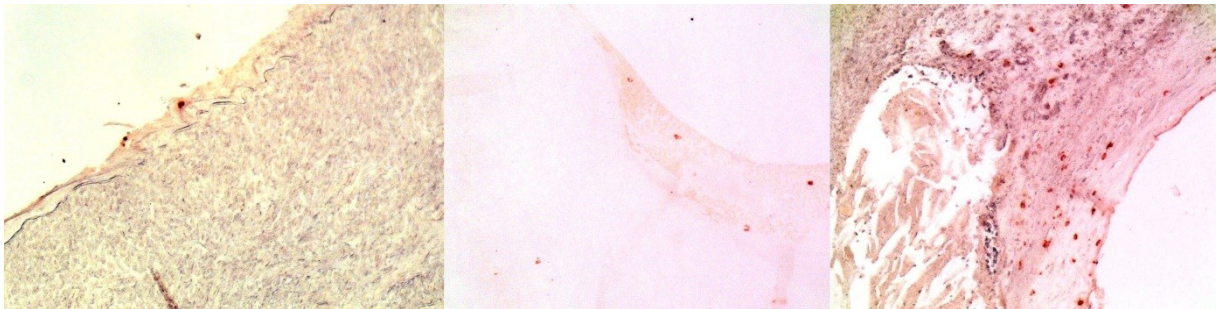


Abb. 28: Immunhistochemische Darstellung von CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x

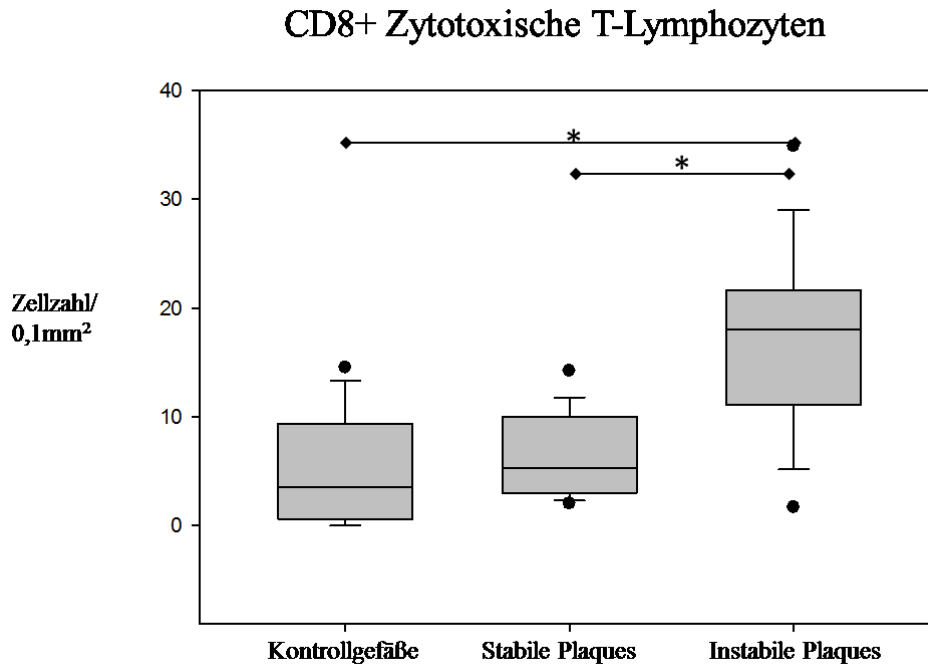


Abb. 29: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD8+ zytotoxischer T-Lymphozyten. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05

Natürliche Killerzellen, eine weitere Subspezies von Lymphozyten, welche in der vorliegenden Dissertation durch die Färbung von CD161 detektiert wurden (Abb. 30), wurden signifikant 1,5-fach häufiger in instabilen Plaques quantifiziert als in stabilen Plaques ($p=0,027$) und auch 6,3-fach häufiger als in Kontrollgewebe (Abb. 31; $p=0,02$). Auch in stabilen Plaques wurden höhere Zahlen CD161+ Zellen als in Kontrollgewebe nachgewiesen (Abb. 31).

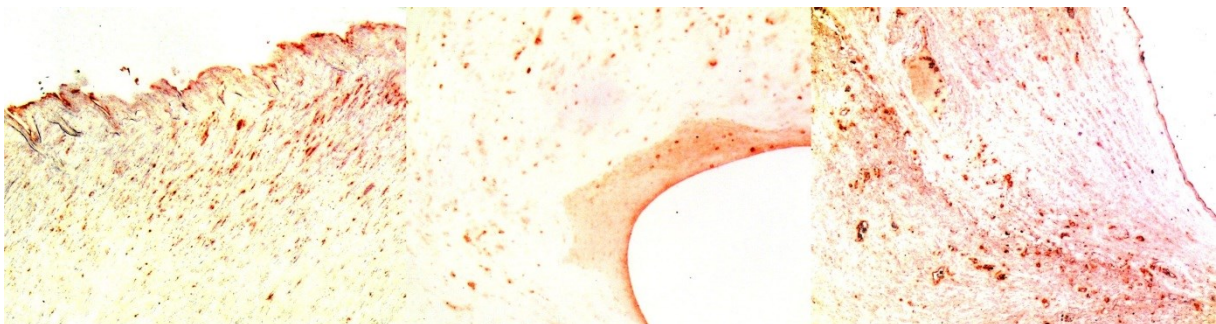


Abb. 30: Immunhistochemische Darstellung von CD161+ NK-Zellen. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x

CD161+ Natürliche Killerzellen

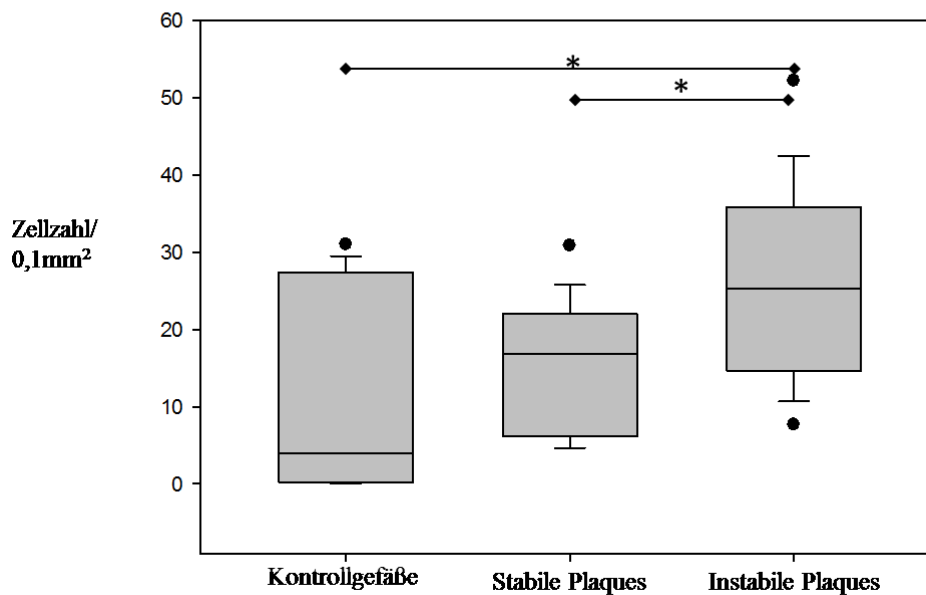


Abb. 31: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD161+ NK-Zellen. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05

In der vorliegenden Arbeit wurden neben den unterschiedlichen für die verschiedenen T-Zell-Subgruppen typischen Oberflächenmarkern auch ein Aktivierungsmarker für T-Zellen untersucht: CD25 (Abb. 32). CD25 wird von aktivierten B- und T-Lymphozyten einschließlich Tregs exprimiert. Bei den CD25+ aktivierten Lymphozyten ließen sich signifikant 6,6-fach mehr in instabilen als in stabilen Plaques ($p=0,004$) quantifizieren. In instabilen Läsionen wurden ebenfalls mehr CD25+ Zellen nachgewiesen als in Kontrollgefäßen (Abb. 33).

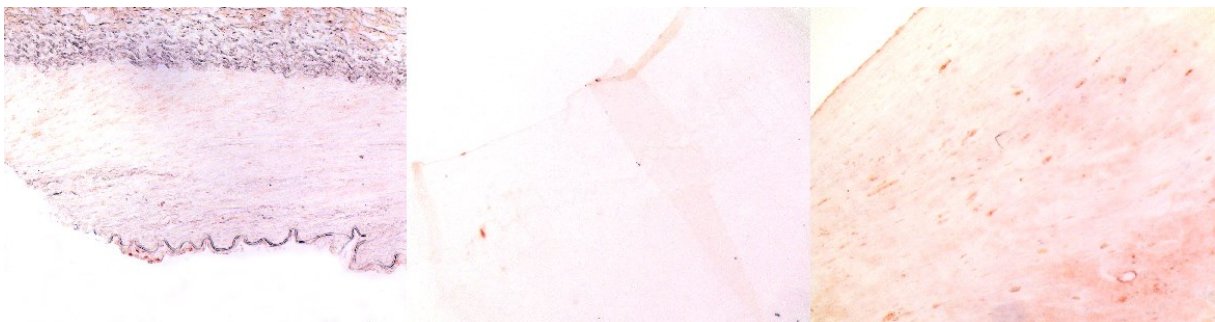


Abb. 32: Immunhistochemische Darstellung von CD25+ aktivierten T-Lymphozyten. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x

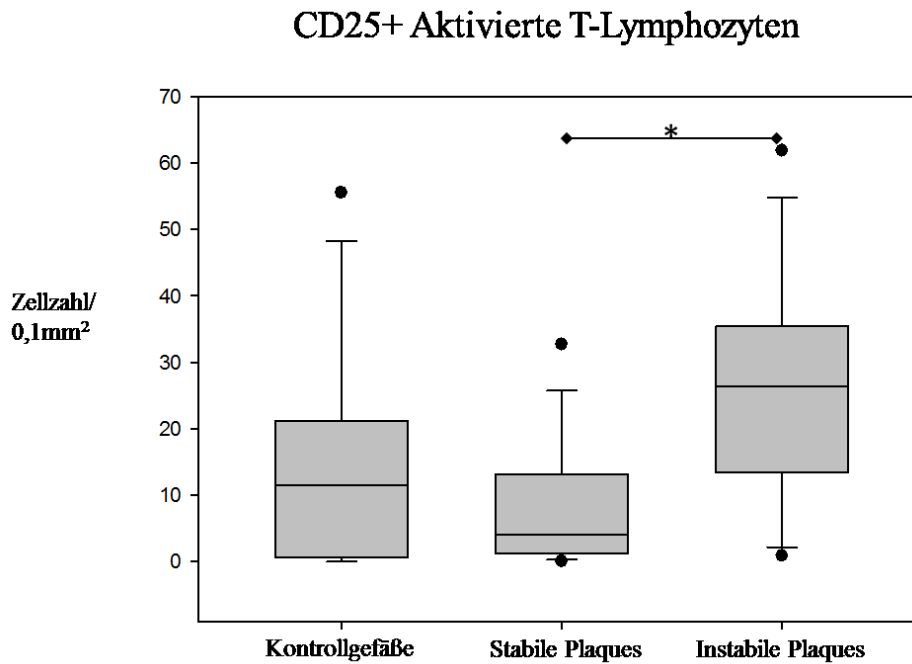


Abb. 33: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD25+ aktivierter T-Lymphozyten. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05

Im Gegensatz zu den proinflammatorischen T-Lymphozyten und DCs wurden bei der Betrachtung von Tregs in den instabilen Plaques signifikant 3,5-fach weniger Zellen nachgewiesen als in stabilen Plaques (Abb. 34, 35; p=0,002). Die stabilen Plaques weisen signifikant höhere Zellzahlen als Kontrollgewebe auf (Abb. 34, 35; p=0,021). Es zeigt sich, dass die Zahl der Tregs bei der Entstehung einer stabilen Plaque im Vergleich zu einem nicht atherosklerotisch veränderten Gefäß zunimmt. Kommt es jedoch zur Destabilisierung der stabilen Läsion und somit zu der Entstehung einer instabilen Plaque, so ist eine signifikant niedrigere Zahl an Tregs zu finden (Abb. 35).



Abb. 34: Immunhistochemische Darstellung von FoxP3+ Tregs. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x

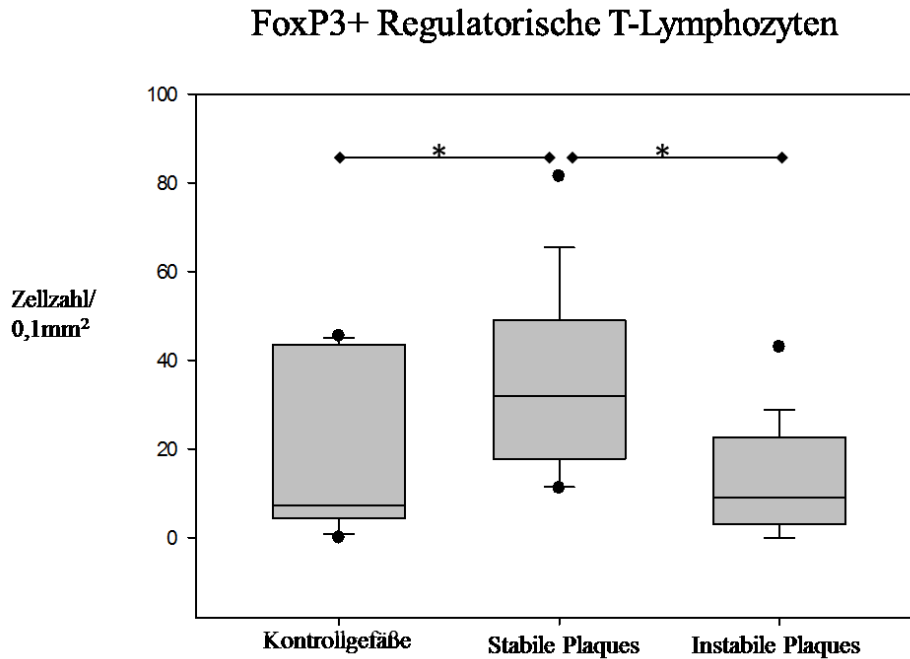


Abb. 35: Statistische Auswertung des Vorkommens von FoxP3+ Tregs. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05

4.2 Expression von Chemokinrezeptoren

Zusätzlich zu den Oberflächenmarkern der dargestellten Immunzellen wurde die Expression von Chemokinrezeptoren beobachtet, um deren Einfluss auf die Einwanderung von Immunzellen bei der Atherogenese zu betrachten (Abb. 36). Bei der Untersuchung der dargestellten Chemokinrezeptoren wurde gezeigt, dass auch die Verteilung dieser Marker signifikant häufiger in instabilen Läsionen ist (Abb. 37).

Die Expression des Chemokinrezeptors CCR6, welcher v.a. auf unreifen DCs zu finden ist, wurde signifikant 2,1-fach häufiger in instabilen Plaques als in stabilen Plaques (p=0,007) sowie Kontrollgewebe (p=0,004) detektiert (Abb. 37).

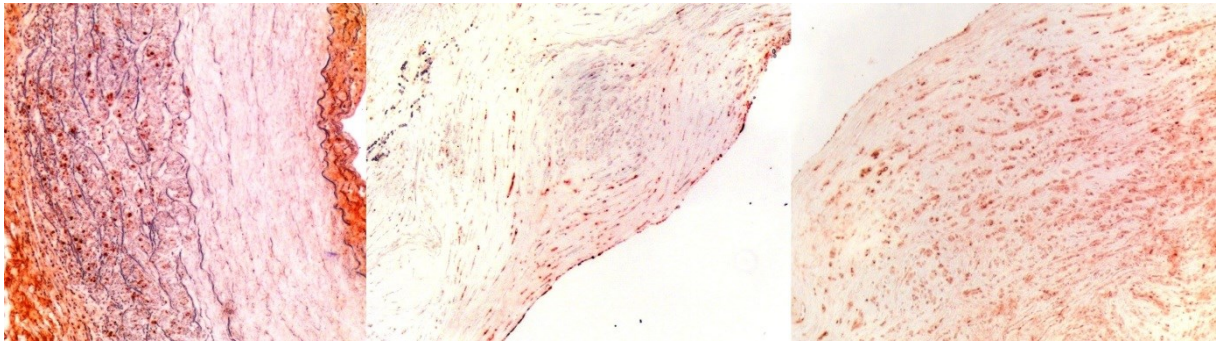


Abb. 36: Immunhistochemische Darstellung von CCR6+ Zellen. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x

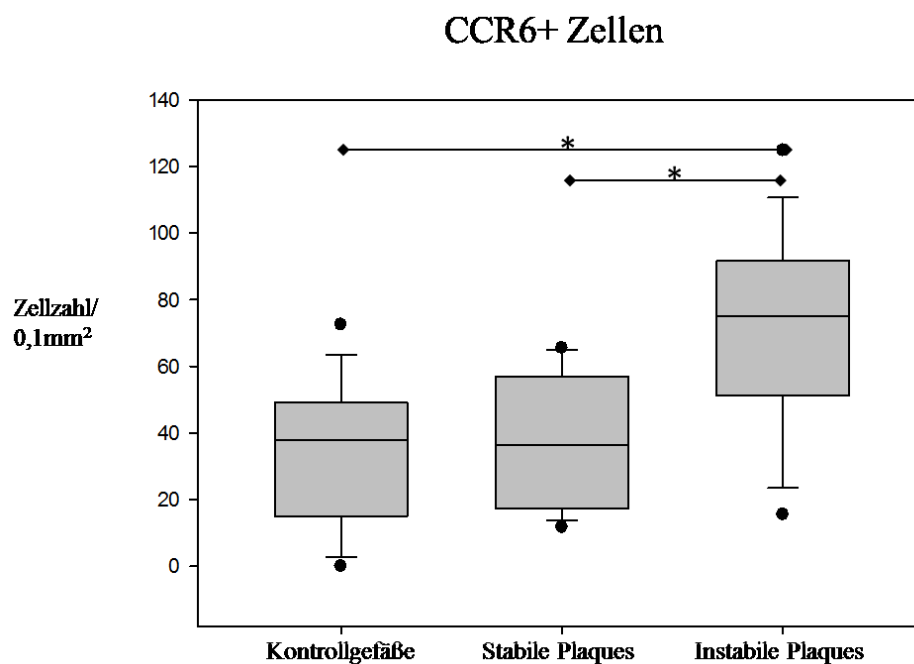


Abb. 37: Statistische Auswertung des Vorkommens von CCR6+ Zellen. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der Untersuchung auf Expression von CCR4 (Abb. 38) erzielt. Dieser Chemokinrezeptor wird hauptsächlich von T-Lymphozyten, aber auch von DCs und B-Lymphozyten exprimiert. Die Zellzahlen waren beim Vergleich der Präparate signifikant 2,1-fach höher in instabilen als in stabilen Läsionen ($p=0,003$) sowie 2,7-fach höher als in Kontrollgewebe (Abb. 39; $p<0,001$). Es fiel auf, dass kaum mehr Zellen in stabilen Plaques als in Kontrollgewebe nachgewiesen wurden (Abb. 39).

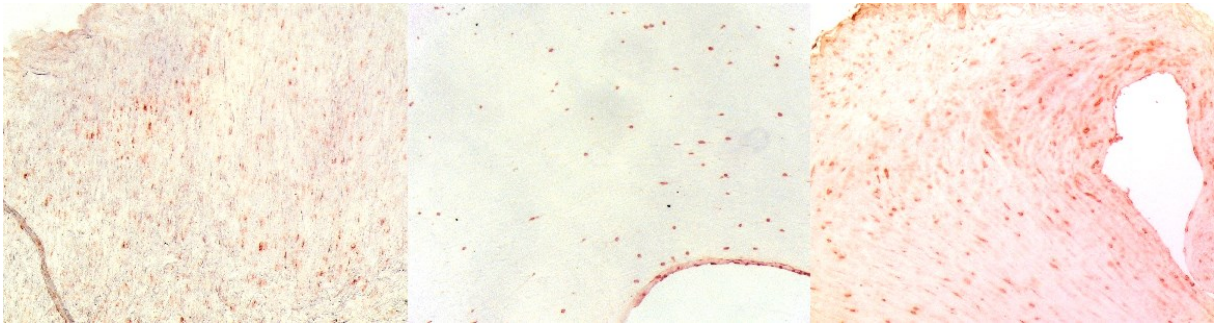


Abb. 38: Immunhistochemische Darstellung von CCR4+ Zellen. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x

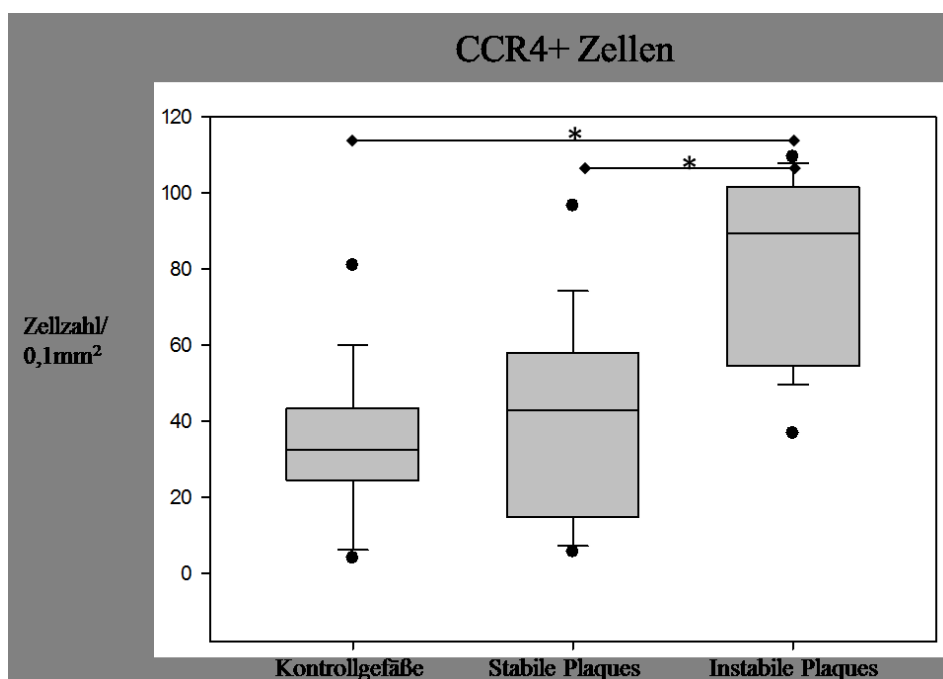


Abb. 39: Statistische Auswertung des Vorkommens von CCR4+ Zellen. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05

4.3 Nachweis von Immunzellen in bestimmten Plaqueregionen

Die Verteilung der Immunzellen wurde ebenfalls analysiert. Bei der Betrachtung Fascin+ mDCs fällt auf, dass die Verteilung der Zellen nicht von der Stabilität der Plaques abhängt. Hier zeigen sich bei stabilen und instabilen Läsionen nahezu gleiche prozentuale Zellverteilungsmuster (Abb. 40).

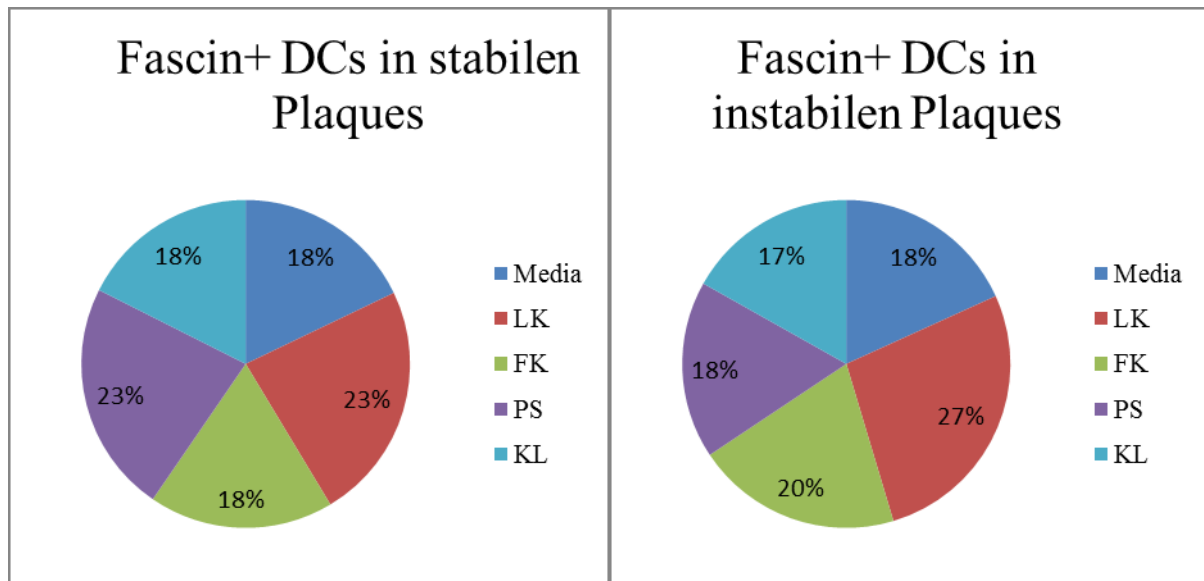


Abb. 40: Verteilung der exprimierten Fascin+ mDCs in den einzelnen Regionen der atherosklerotischen Plaques in %. LK= Lipidkern, FK= Fibröse Kappe, PS= Plaqueschultern, KL= Kontralaterale Seite

Vergleicht man die Verteilung CD4+ T-Lymphozyten in instabilen sowie stabilen Plaques, so wird deutlich, dass in instabilen atherosklerotischen Plaques diese Zellen zunehmend im Lipidkern, der fibrösen Kappe und den Plaqueschultern zu finden sind. In der kontralateralen Seite und der Media sinkt der prozentuale Anteil der Zellen mit zunehmender Instabilität (Abb. 41).

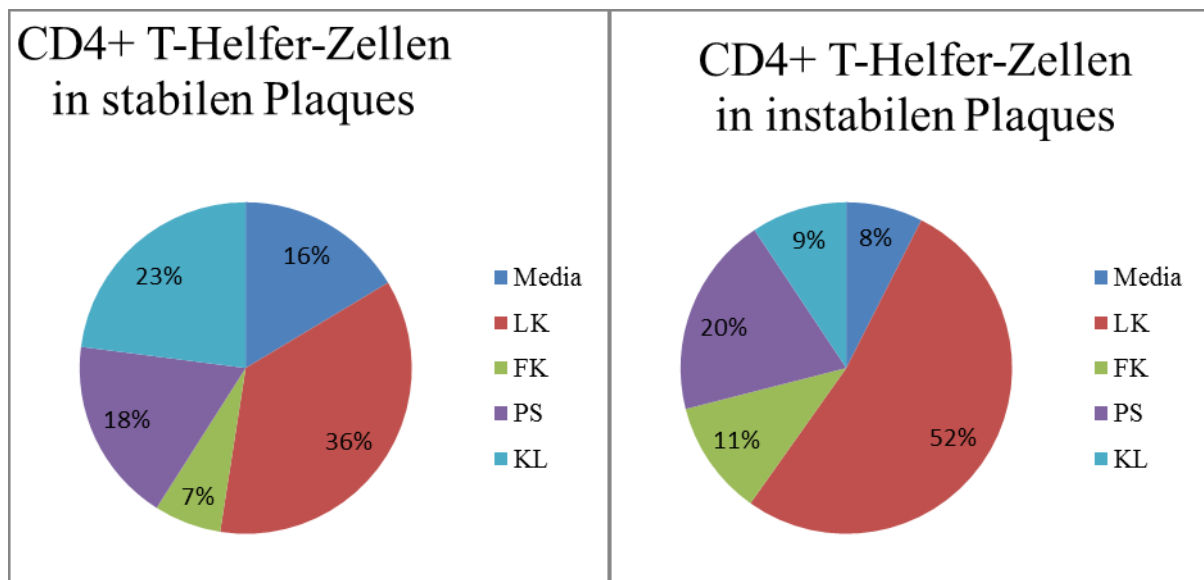


Abb. 41: Verteilung der exprimierten CD4+ T-Helfer-Zellen in den einzelnen Regionen der atherosklerotischen Plaques in %. LK= Lipidkern, FK= Fibröse Kappe, PS= Plaqueschultern, KL= Kontralaterale Seite

Der Anteil der Tregs ist in instabilen im Vergleich zu stabilen Plaques deutlich zu Gunsten des Lipidkerns verschoben bei allerdings deutlich geringerem Vorkommen der Tregs in instabilen Plaques (s.o.), sodass von einer relativen Abnahme der Zellen in den Plaqueschultern auszugehen ist. Mehr als die Hälfte der Tregs wurden in dieser Plaqueregion gefunden, obwohl weniger Tregs insgesamt in instabilen Läsionen exprimiert werden. In den für Rupturen gefährdeten Plaqueschultern zeigten sich in instabilen Plaques sowohl absolut als auch relativ gesehen niedrigere Zellzahlen für Tregs (Abb. 42).

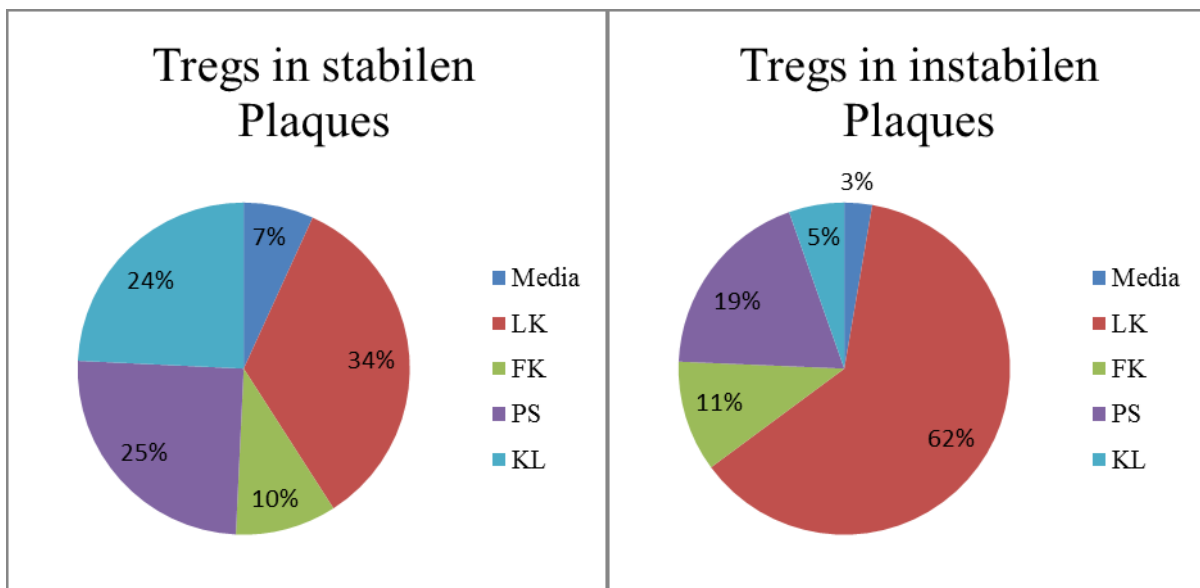


Abb. 42: Verteilung der exprimierten FoxP3+ Tregs in den einzelnen Regionen der atherosklerotischen Plaques in %. LK= Lipidkern, FK= Fibröse Kappe, PS= Plaqueschultern, KL= Kontralaterale Seite

4.4 Korrelation verschiedener Immunzellen und Immunmarker

Weiterhin wurden bei der Studie auch Korrelationsanalysen durchgeführt, um zu prüfen, ob das Vorkommen der proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zellen miteinander oder mit der Expression von Chemokinrezeptoren korreliert. Es ergaben sich dabei folgende signifikante Ergebnisse.

4.4.1 Korrelation proinflammatorischer Immunzellen miteinander

Es wurden signifikante positive Korrelationen zwischen DCs und T-Lymphozyten nachgewiesen. Die Zahl der DCs, repräsentiert durch Fascin, korreliert signifikant positiv mit dem auf T-Helfer-Zellen exprimierten Oberflächenantigen CD4 ($r=0,66$; $p<0,001$; Abb. 43)

sowie mit zytotoxischen T-Lymphozyten, welche durch CD8 dargestellt sind ($r=0,55$; $p=0,002$; Abb. 44).

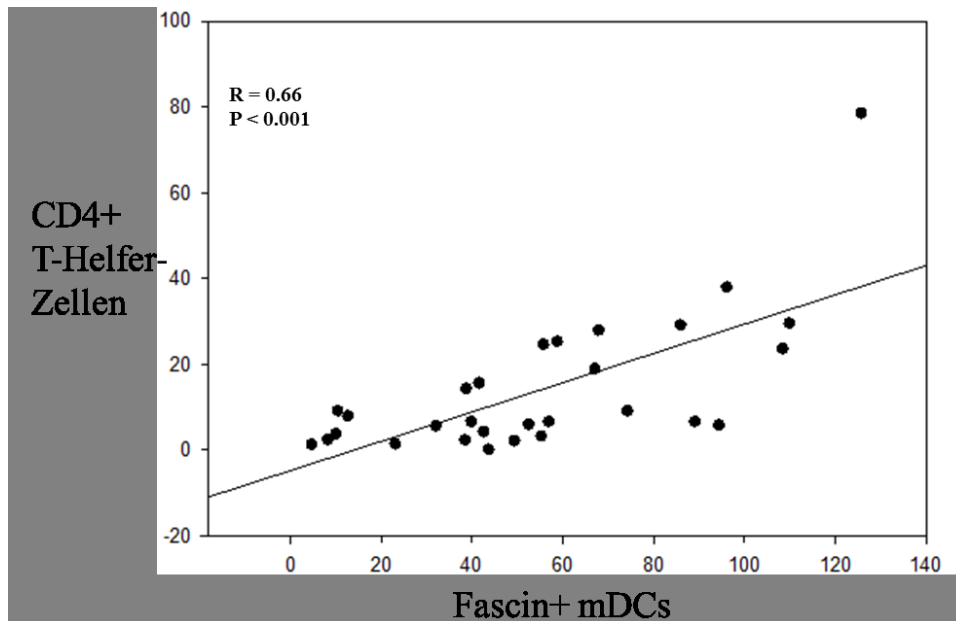


Abb. 43: Korrelation zwischen Fascin+ mDCs und CD4+ T-Helfer-Zellen in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

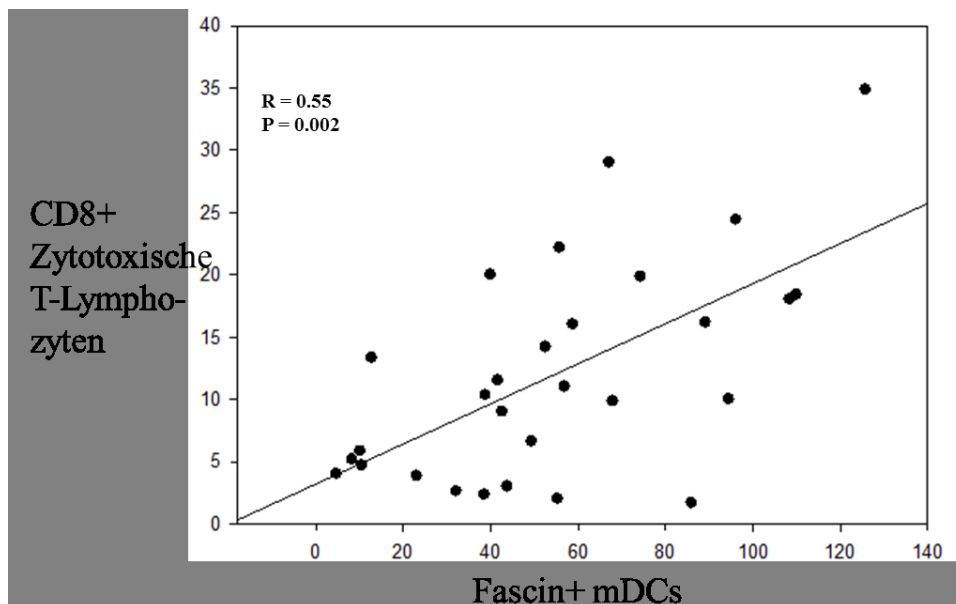


Abb. 44: Korrelation zwischen Fascin+ mDCs und CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

Auch zwischen Fascin+ mDCs und aktivierten T-Lymphozyten (CD25) ergab sich eine signifikante positive Korrelation ($r=0,56$; $p=0,002$; Abb. 45). Dies weist darauf hin, dass nicht nur die Zahl an T-Zellen von der Zahl an mDCs abhängig ist, sondern auch der Grad der T-

Zell-Aktivierung durch das Vorhandensein von mDCs gefördert wird, was auch aufgrund der signifikanten Korrelation reifer, funktionell aktiver DCs (CD83+) mit CD4+ T-Lymphozyten zu erwarten ist ($r=0,66$; $p<0,001$; Abb. 46).

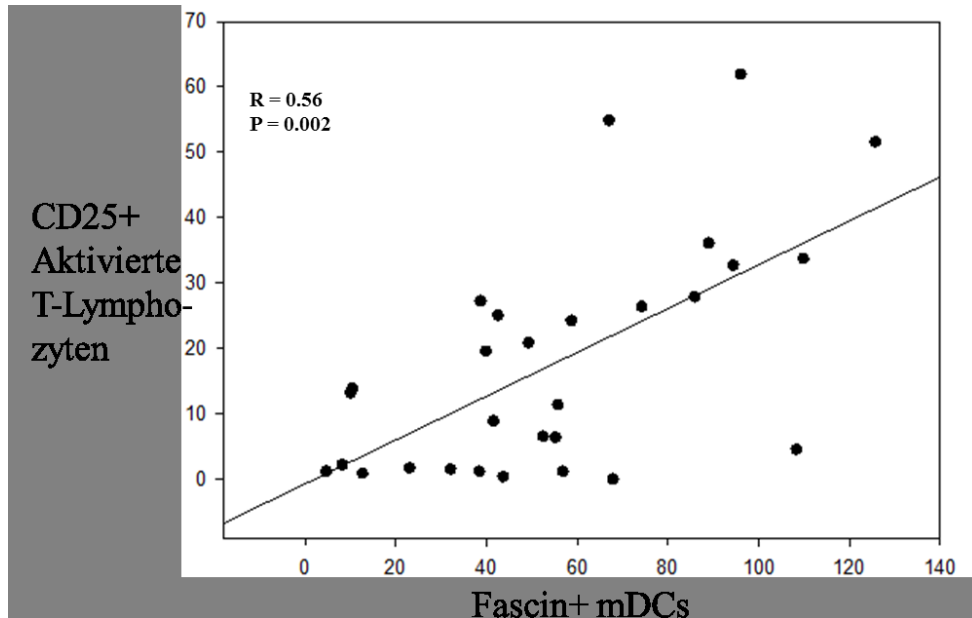


Abb. 45: Korrelation zwischen Fascin+ mDCs und CD25+ aktivierten T-Lymphozyten in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

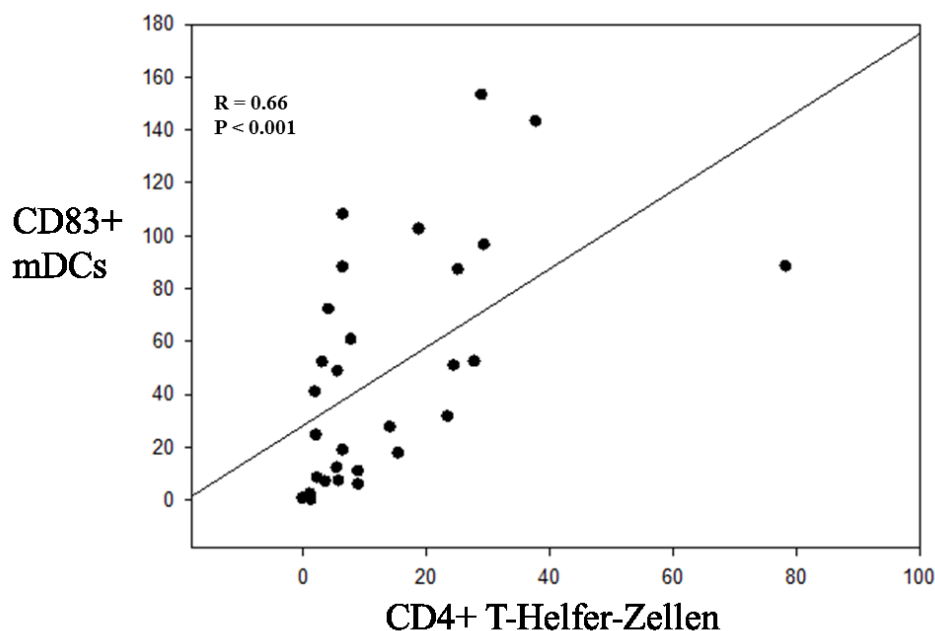


Abb. 46: Korrelation zwischen CD4+ T-Helfer-Zellen und CD83+ mDCs in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

Ebenfalls korreliert der DC-Marker CD209 mit den oben genannten T-Lymphozytenmarkern signifikant positiv (Korrelation mit CD4: $r=0,59$; $p<0,001$; Abb. 47), (Korrelation mit CD8: $r=0,67$; $p<0,001$; Abb. 48).

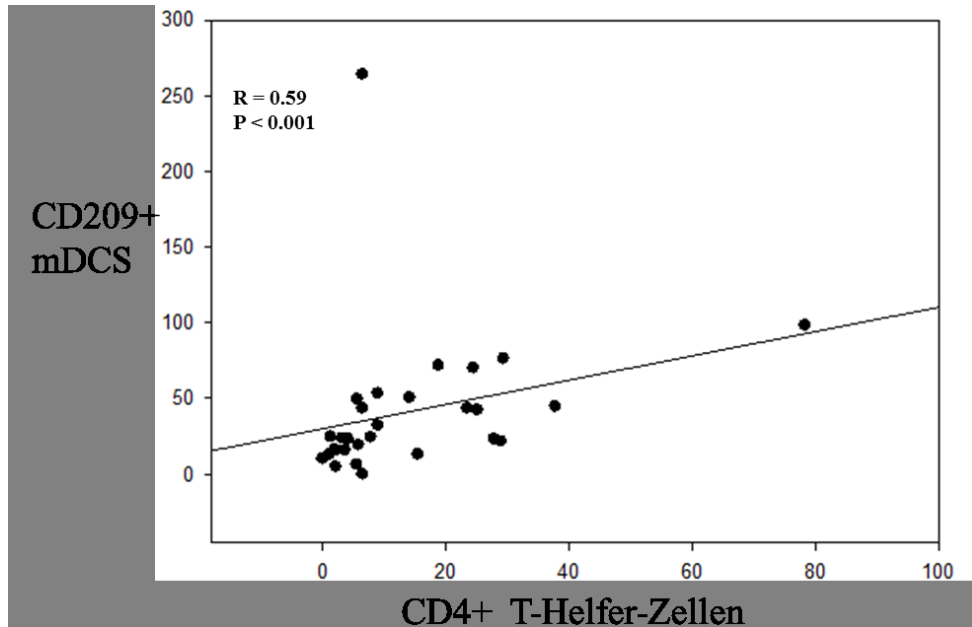


Abb. 47: Korrelation zwischen CD4+ T-Helfer-Zellen und CD209+ mDCs in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

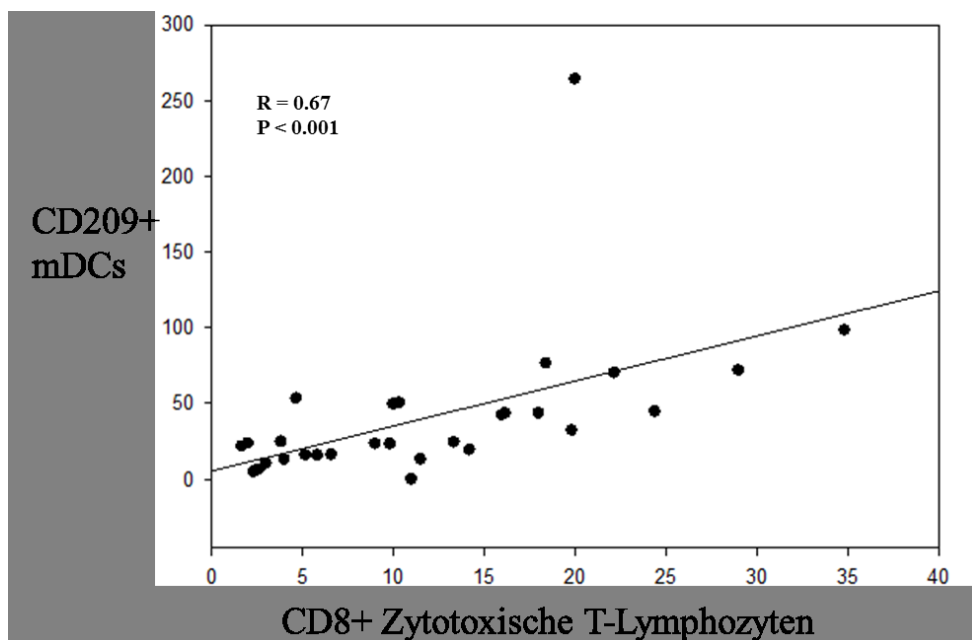


Abb. 48: Korrelation zwischen CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten und CD209+ mDCs in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

Im Hinblick auf die Aktivität von T-Lymphozyten ergab sich Folgendes: Auch die Zahl unreifer CD209+ mDCs weist eine signifikante positive Korrelation mit CD25+ aktivierten T-Lymphozyten auf ($r=0,67$; $p<0,001$; Abb. 49).

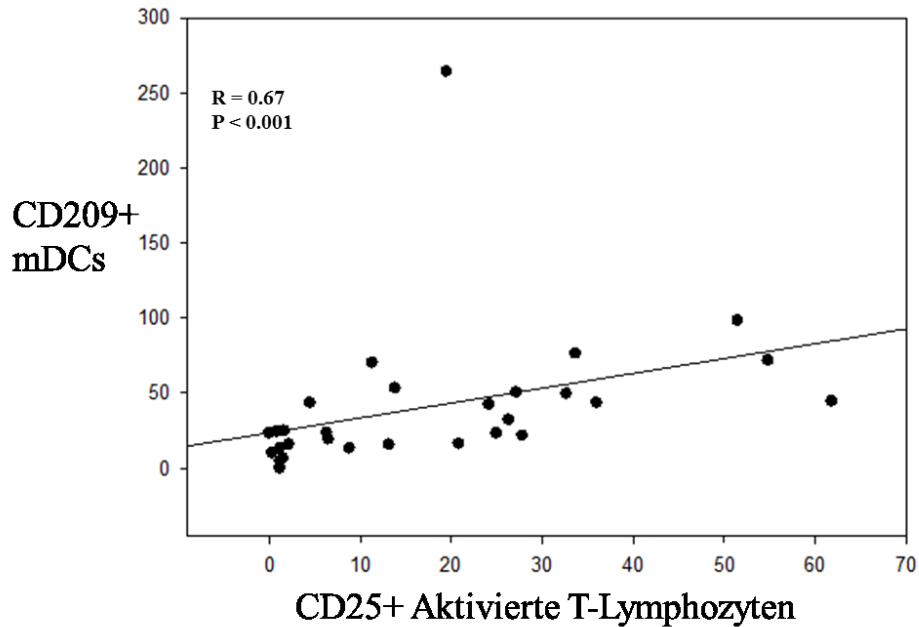


Abb. 49: Korrelation zwischen CD25+ aktivierten T-Lymphozyten und CD209+ mDCs in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

Hervorzuheben ist außerdem eine signifikante positive Korrelation zwischen DCs (Fascin) und NK-Zellen (CD161) ($r=0,61$; $p<0,001$; Abb. 50).

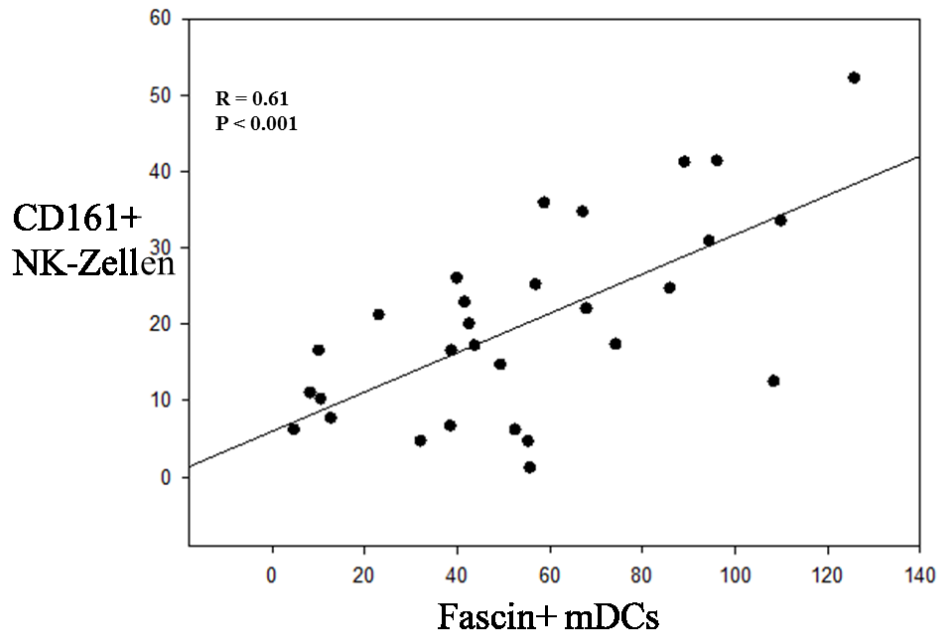


Abb. 50: Korrelation zwischen Fascin+ mDCs und CD161+ NK-Zellen in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

Die Marker der Subtypen der T-Lymphozyten CD8 und CD4 korrelieren untereinander wie erwartet signifikant ($r=0,65$; $p<0,001$; Abb. 51) Die positive Korrelation impliziert eine gleichsinnige Einwanderung zytotoxischer T-Lymphozyten und T-Helfer-Zellen in die atherosklerotisch veränderte Gefäßwand mit zunehmender Instabilität.

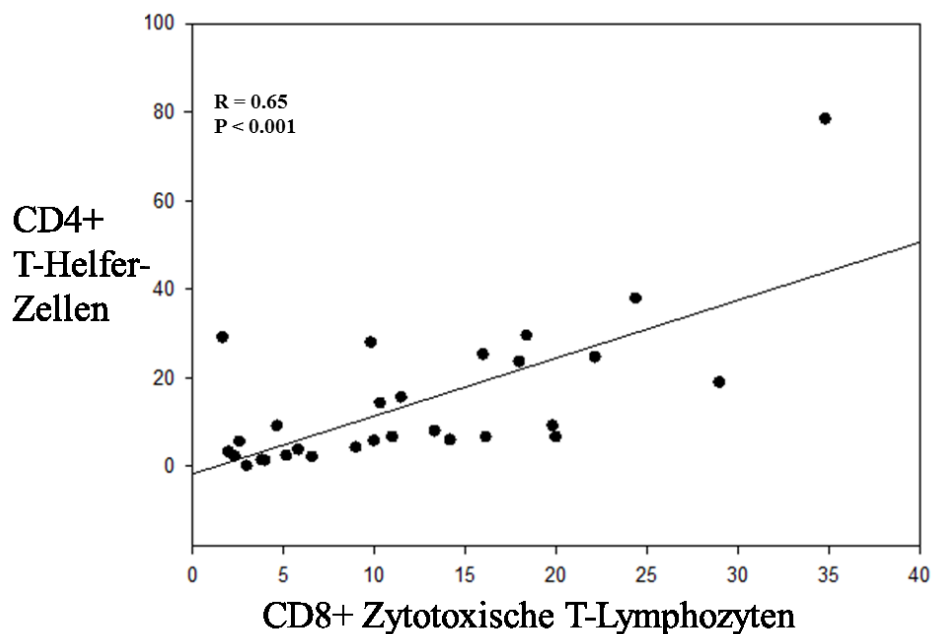


Abb. 51: Korrelation zwischen CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten und CD4+ T-Helfer-Zellen in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

Des Weiteren wurden ebenfalls signifikante positive Korrelationen zwischen verschiedenen Subtypen der DCs gezeigt. Da CD83+ mDCs und CD209+ mDCs ($r=0,56$; $p=0,002$; Abb. 52) signifikant positive Korrelationskoeffizienten aufwiesen, ist davon auszugehen, dass sowohl reife als auch unreife DCs gleichsinnig in atherosklerotische Läsionen bei Zunahme der Instabilität einwandern.

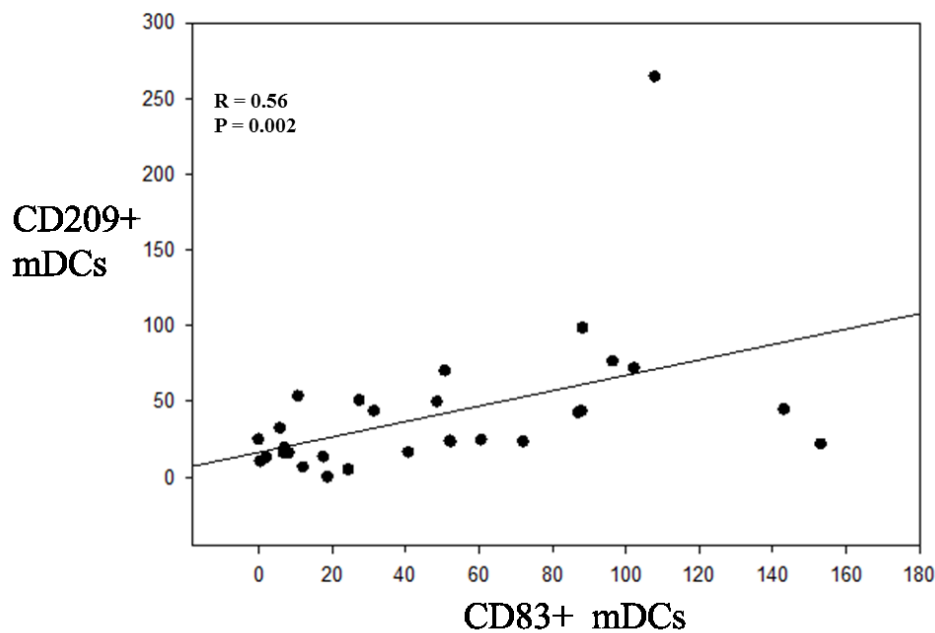


Abb. 52: Korrelation zwischen CD83+ mDCs und CD209+ mDCs in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

4.4.2 Korrelation proinflammatorischer Immunzellen mit Aktivierungsmarkern

Der für antigenpräsentierende Zellen typische Aktivierungsmarker HLA-DR korreliert, wie erwartet, signifikant sowohl mit Fascin+ mDCs ($r=0,6$; $p<0,001$; Abb. 53) als auch mit S100+ mDCs ($r=0,43$; $p<0,02$; Abb. 54). Dies zeigt uns, dass bei der Zunahme der Zahl an mDCs auch deren Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren zunimmt. Es findet also nicht nur eine quantitative, sondern auch eine funktionelle Änderung statt.

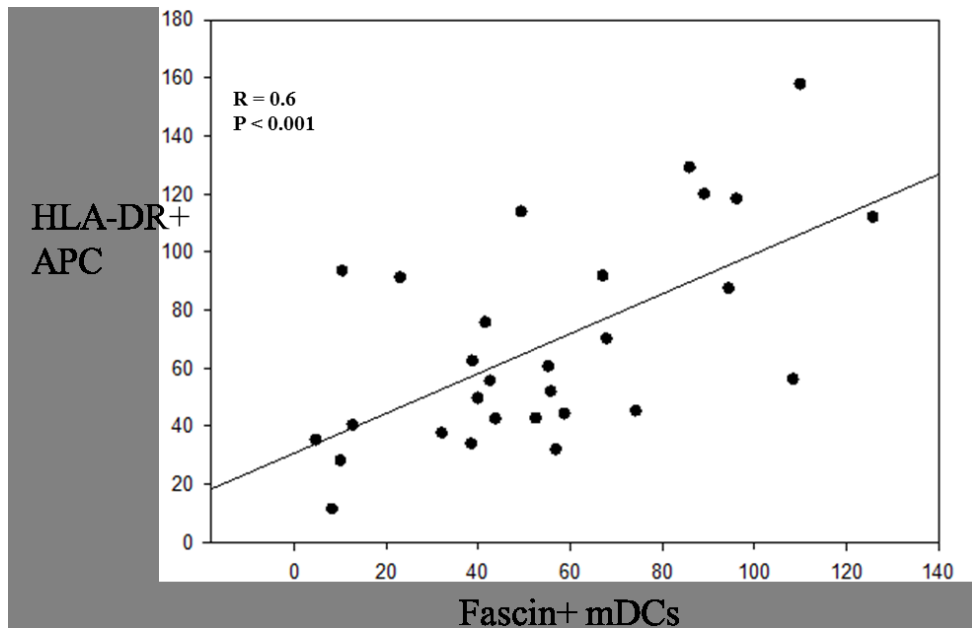


Abb. 53: Korrelation zwischen Fascin+ mDCs und der HLA-DR+ APC in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

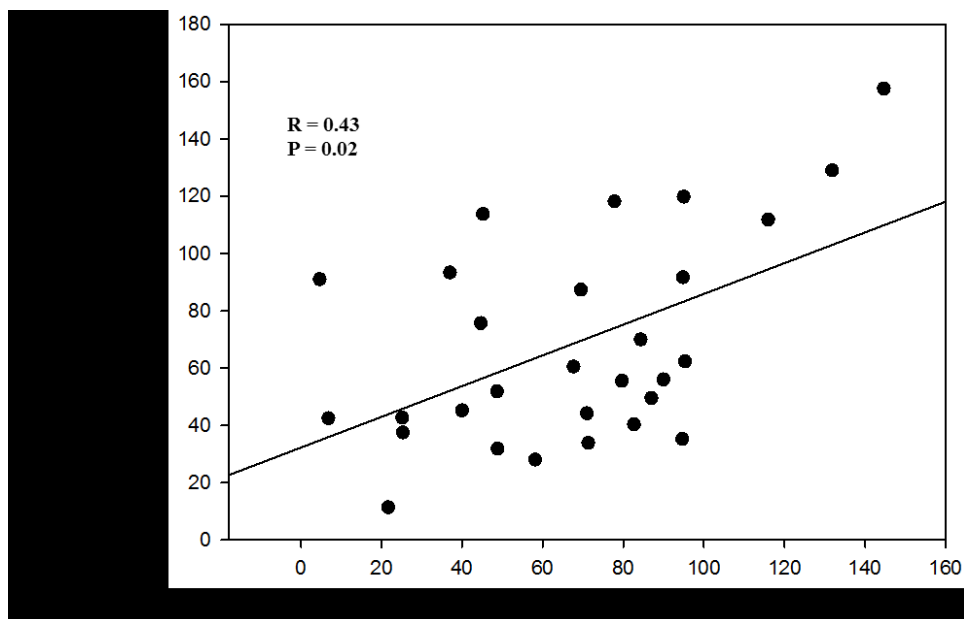


Abb. 54: Korrelation zwischen S100+ mDCs und der HLA-DR+ APC in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

Die Zahl proinflammatorischer CD3+ T-Lymphozyten ($r=0,54$; $p<0,003$; Abb. 55) korreliert signifikant mit der Expression des Aktivierungsmarkers CD25, was bedeutet, dass die Zahl an T-Lymphozyten im selben Maß wie ihre Aktivierung zunimmt.

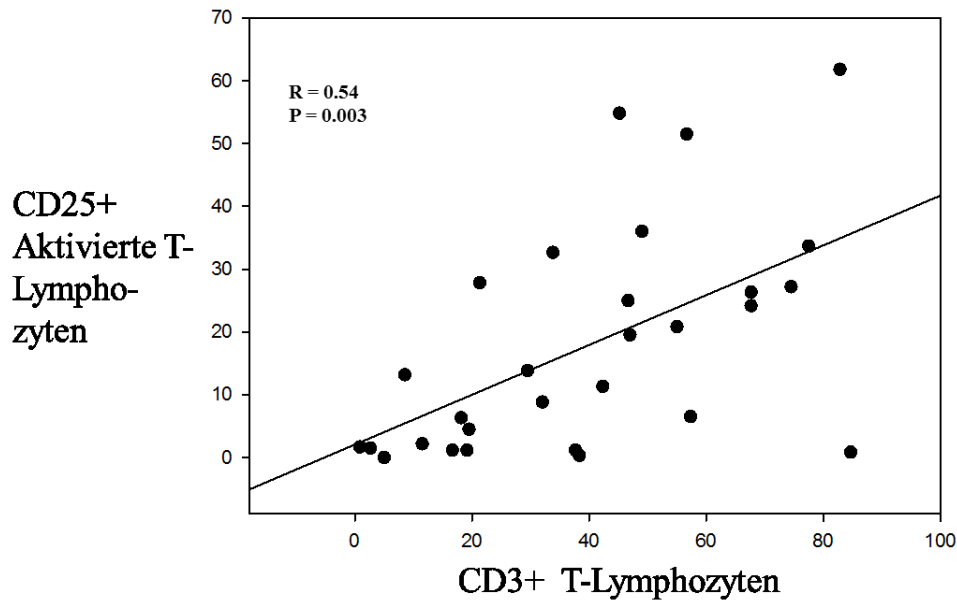


Abb. 55: Korrelation zwischen CD3+ T-Lymphozyten und der CD25+ aktivierten T-Lymphozyten in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

Auch die Anzahl der CD4+ T-Helfer-Zellen, einer Subspezies der T-Lymphozyten, korreliert positiv mit der Zahl aktivierter CD25+ T-Lymphozyten ($r=0,51$; $p<0,004$; Abb. 56)

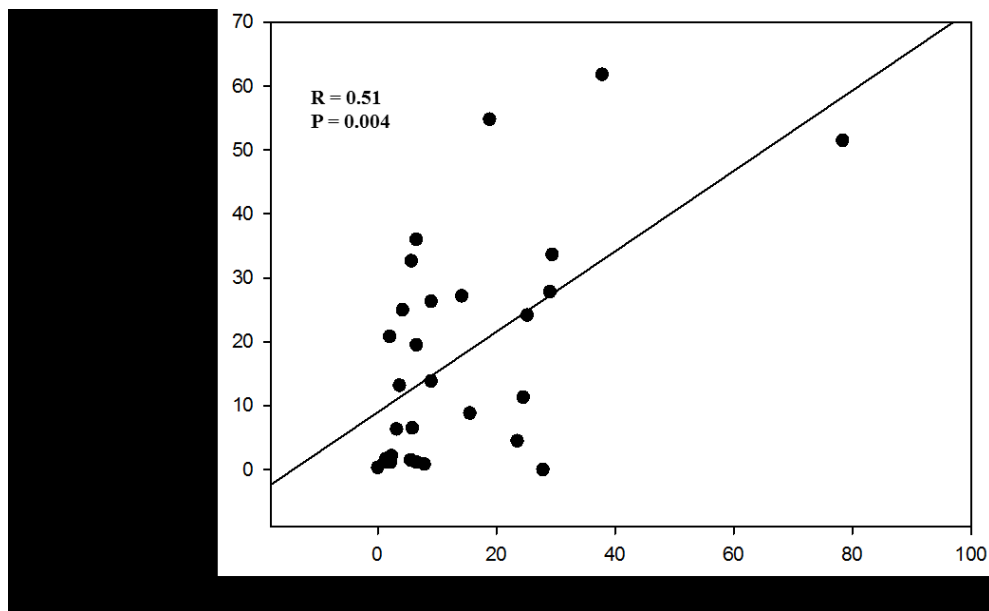


Abb. 56: Korrelation zwischen CD4+ T-Helfer-Zellen und der CD25+ aktivierten T-Lymphozyten in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

Zwischen CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten und aktivierten CD25⁺ T-Lymphozyten wurde ebenfalls eine signifikante positive Korrelation gezeigt ($r=0,53$; $p<0,003$; Abb. 57).

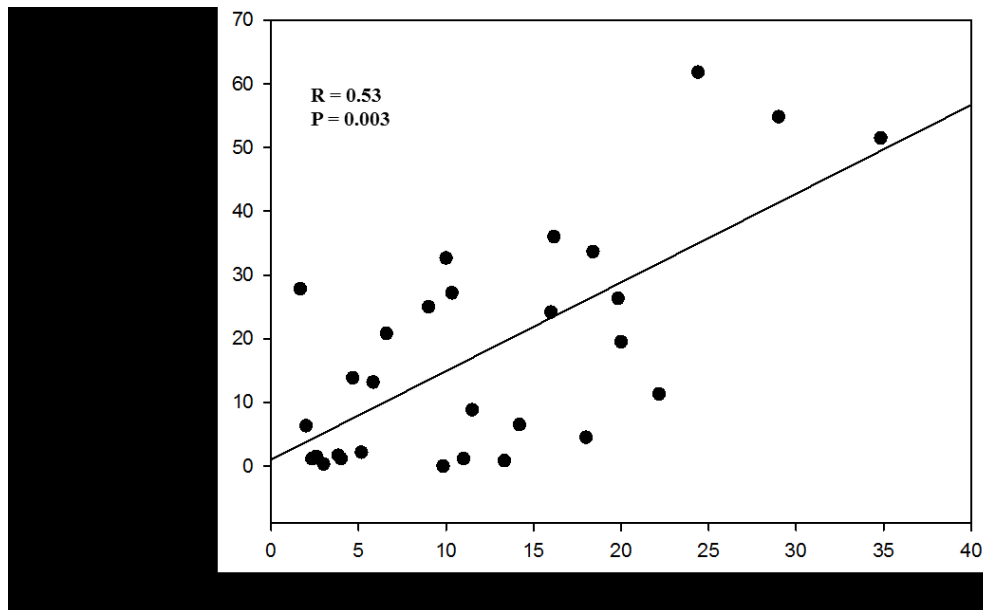


Abb. 57: Korrelation zwischen CD8⁺ Zytotoxischen T-Lymphozyten und der CD25⁺ aktivierten T-Lymphozyten in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

Der Aktivierungsmarker für antigenpräsentierende Zellen HLA-DR korreliert signifikant positiv mit CD25, dem Marker für aktivierte T-Lymphozyten ($r=0,67$; $p<0,001$; Abb. 58), wobei der Korrelationskoeffizient sehr hoch ist. Dies Ergebnis ist auch zu erwarten, da für die Aktivierung von T-Lymphozyten und damit CD25⁺ Expression das Vorhandensein der Expression von HLA-DR erforderlich ist.

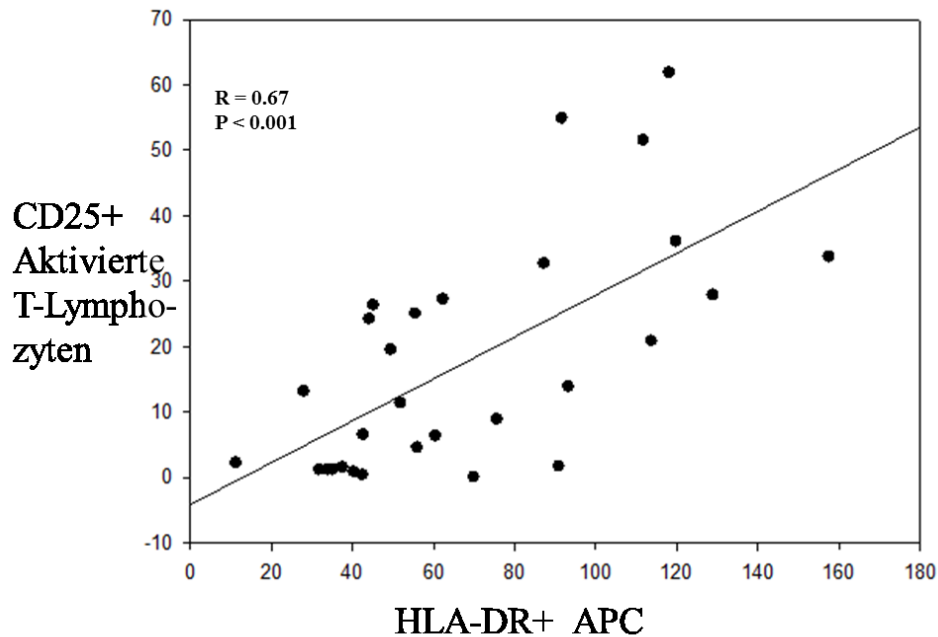


Abb. 58: Korrelation zwischen HLA-DR+ APC und CD25+ aktivierten T-Lymphozyten in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

4.4.3 Korrelation proinflammatorischer T-Lymphozyten mit Chemokinrezeptoren

Um die Chemoattraktion als einen möglichen Trigger für die Einwanderung der Immunzellen zu untersuchen, wurde auch das Vorliegen einer Korrelation proinflammatorischer Zellen mit Chemokinrezeptoren geprüft. Eine signifikante positive Korrelation wurde z.B. zwischen CD3+ T-Lymphozyten und dem Chemokinrezeptor CCR4, welcher auf T-Lymphozyten vorkommt, gezeigt ($r=0,56$; $p=0,002$; Abb. 59). Das weist darauf hin, dass das Vorhandensein von CCR4 für die Einwanderung von T-Zellen wichtig zu sein scheint.

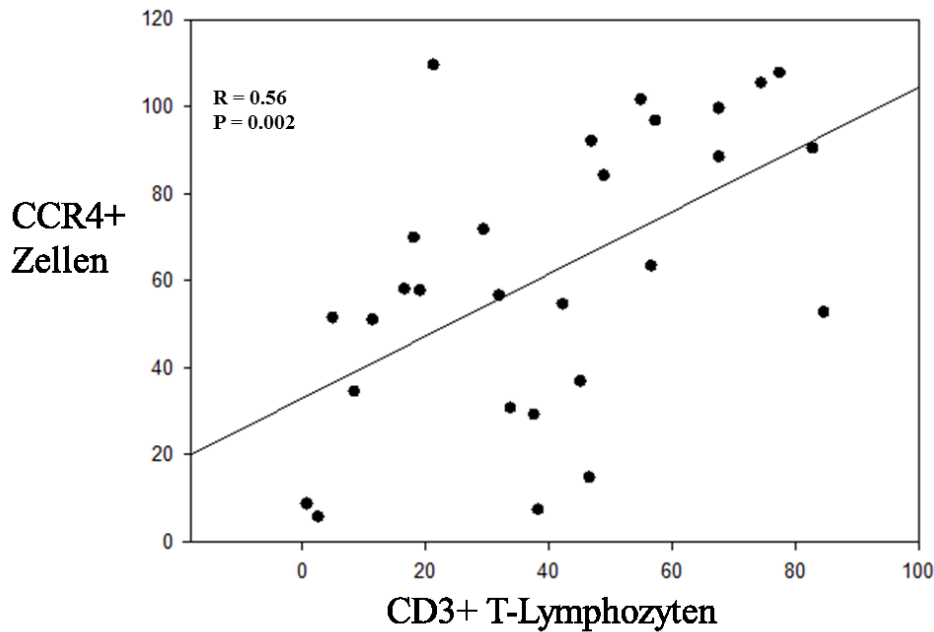


Abb. 59: Korrelation zwischen CD3+ T-Lymphozyten und der CCR4+ Zellen in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

4.4.4 Korrelation regulatorischer T-Lymphozyten mit proinflammatorischen Zellen, Chemokinrezeptoren

Zwischen antiinflammatorischen FoxP3+ Tregs und proinflammatorischen Zellen wurde eine signifikante inverse Korrelation beobachtet. Je höher die Zahl der nachgewiesenen Tregs, desto geringer ist die Zahl der mDCs, was darauf hinweist, dass diese beiden Zelltypen in der Entwicklung der Atherosklerose gegensätzliche Funktionen haben. Sowohl unreife (CD209) ($r=-0,43$; $p=0,02$; Abb. 60) als auch reife DCs (CD83) ($r=-0,39$; $p=0,04$; Abb. 61) korrelieren signifikant negativ mit Tregs. Somit konnte dargestellt werden, dass es durch eine Zunahme myeloider DCs zu einer Abnahme regulatorischer T-Zellen kommen könnte, was uns zeigt, dass mDCs die Häufigkeit von Tregs möglicherweise supprimieren, somit eine Verminderung der Anti-Inflammation bewirken.

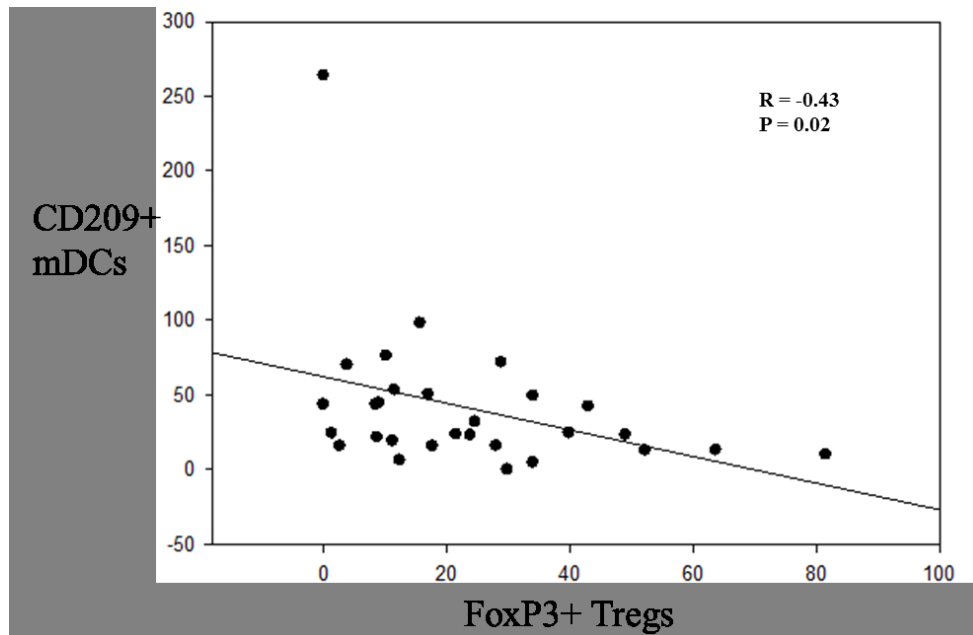


Abb. 60: Korrelation zwischen FoxP3+ Tregs und CD209+ mDCs in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

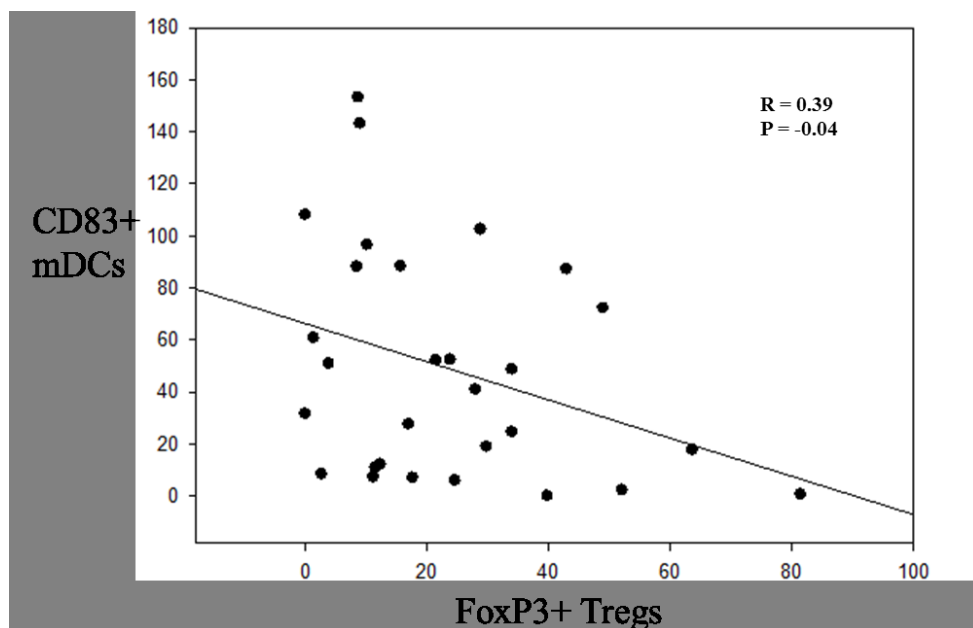


Abb. 61: Korrelation zwischen FoxP3+ Tregs und CD83+ mDCs in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

Aber auch CD4+ T-Helfer-Zellen korrelieren signifikant invers zum Vorhandensein des Treg-Markers FoxP3 ($r=-0,4$; $p=0,03$; Abb. 62). Bei einer niedrigen Zellzahl von Tregs zeigte sich eine Häufung der T-Helfer-Zellen. Bei Plaques mit eher zahlreich dargestellten Tregs wurde ein geringeres Vorkommen von CD4+ Zellen beobachtet.

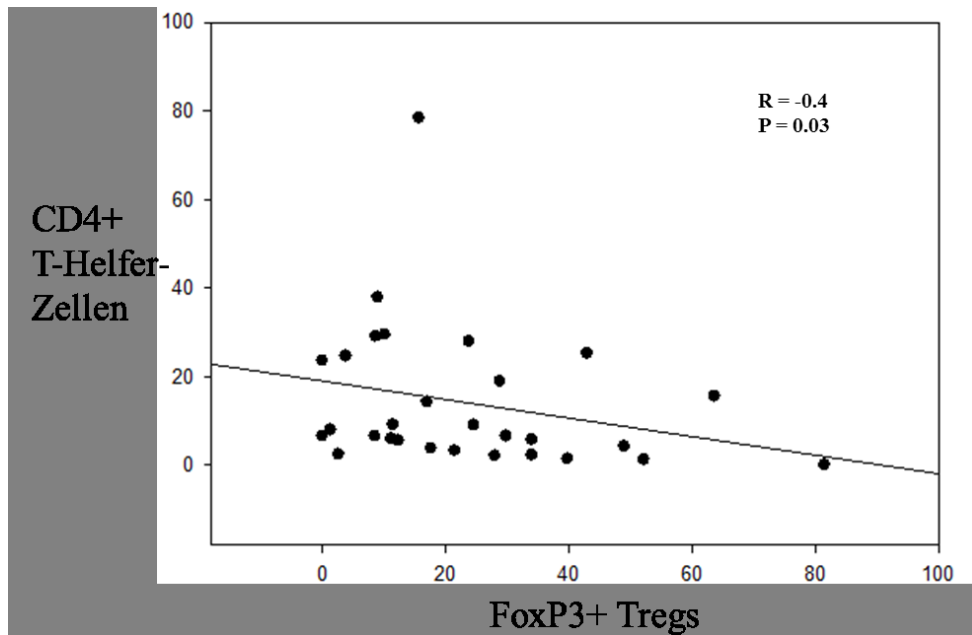


Abb. 62: Korrelation zwischen FoxP3+ Tregs und CD4+ T-Helfer-Zellen in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

Es wurde ebenso eine negative Korrelation zwischen dem Chemokinrezeptor CCR4 und der Zahl an FoxP3+ Tregs gezeigt ($r=-0,38$; $p<0,05$; Abb. 63).

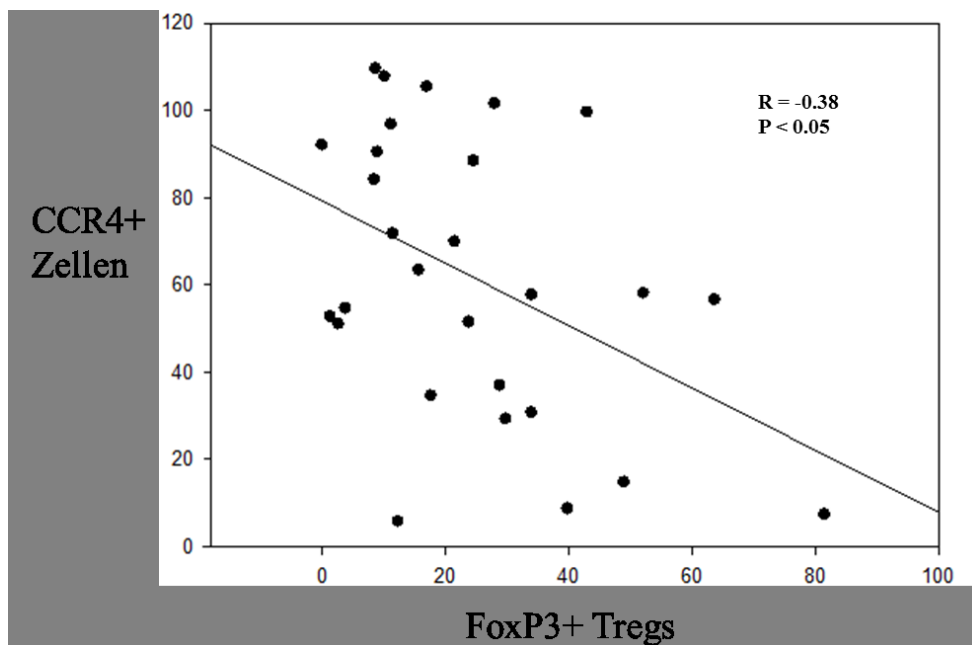


Abb. 63: Korrelation zwischen FoxP3+ Tregs und der CCR4+ Zellen in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm².

4.5 Klinische Daten

Tabelle 5 zeigt die erhobenen klinischen Daten der Patienten, bei welchen die untersuchten Plaques entnommen wurden. Der Median des Alters der Patienten liegt bei 75 Jahren. 57% der Patienten mit stabilen Plaques und 87% der Patienten mit instabilen Plaques sind männlich. Der Median des BMI beträgt bei den Patienten, welchen stabile Plaques entnommen wurden, 28,1 [25,3-29,7] und bei Patienten mit instabilen Plaques 26,4 [24,5-29,1]. Der Median des Stenosegrades beträgt in der Gruppe der stabilen Plaques 80% [70-100], in der Gruppe der instabilen Plaques 90% [80-100]. 64% der Patienten mit stabilen Läsionen und 67% der Patienten mit instabilen Läsionen zeigten eine akute Symptomatik. Zwischen der Gruppe der Patienten mit stabilen Plaques und der Gruppe der Patienten mit instabilen Plaques wurden keine signifikanten Unterschiede in Hinsicht auf Alter, BMI, Geschlecht, Symptomatik und Stenosegrad nachgewiesen. Auch bei Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und Adipositas wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt. Die Blutwerte der Patienten der einzelnen Gruppen sowie Vorerkrankungen und Medikamentenanamnese unterscheiden sich ebenfalls nicht signifikant (Tab. 5).

| | Stabile Plaques (n=14) | | Instabile Plaques (n=15) | | <i>p-Wert</i> |
|---|------------------------|-----------|--------------------------|-----------|---------------|
| | Median | 25-75% CI | Median | 25-75% CI | |
| Alter (in Jahren) | 69.5 | 57.8-78 | 75 | 72-77 | <i>n.s.</i> |
| BMI | 28.1 | 25.3-29.7 | 26.4 | 24.5-29.1 | <i>n.s.</i> |
| Geschlecht, männlich (%) | 57 | | 87 | | <i>n.s.</i> |
| Ischämische Symptome (%) | 64 | | 67 | | <i>n.s.</i> |
| Präoperative Darstellung | | | | | |
| Stenosegrad (in %) | 80 | 70-100 | 90 | 80-100 | <i>n.s.</i> |
| Blutwerte | | | | | |
| Leukozyten (*10³/μl) | 9.5 | 6.7-14.4 | 8.1 | 7-10.1 | <i>n.s.</i> |
| CRP (mg/l) | 9.3 | 1-35 | 2.1 | 1-32 | <i>n.s.</i> |
| Kreatinin (μmol/l) | 86 | 66-157 | 74 | 60-133 | <i>n.s.</i> |
| Vorerkrankungen | | | | | |
| Hypertonus (%) | 100 | | 93 | | <i>n.s.</i> |
| Hyperlipidämie (%) | 100 | | 73 | | <i>n.s.</i> |
| Adipositas(%) | 14 | | 20 | | <i>n.s.</i> |
| KHK (%) | 21 | | 53 | | <i>n.s.</i> |
| Chronische Niereninsuffizienz (GFR<50 ml/min (%)) | 29 | | 33 | | <i>n.s.</i> |
| Diabetes (%) | 36 | | 47 | | <i>n.s.</i> |
| Medikation | | | | | |
| Statintherapie (%) | 93 | | 60 | | <i>p=0.08</i> |
| ASS (%) | 71 | | 60 | | <i>n.s.</i> |
| Betablocker (%) | 43 | | 73 | | <i>n.s.</i> |
| ACE Hemmer (%) | 43 | | 60 | | <i>n.s.</i> |

Tab. 5: Klinische Daten. n.s.= nicht signifikant

4.5.1 Korrelation verschiedener Immunzellen mit klinischen Daten

Bei der Auswertung der klinischen Daten fiel auf, dass es keine signifikanten Korrelationen zwischen der Anzahl proinflammatorischer T-Lymphozyten, DCs oder Tregs und bestimmten kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Übergewicht oder Hypertonie gibt. Die Zellzahlen korrelierten auch nicht mit akuten Symptomen wie Transitorisch ischämischen Attacken, Apoplex oder akuten Ischämien der Beine und auch nicht mit diversen Vorerkrankungen wie der chronischen Niereninsuffizienz und der KHK.

Ebenso gibt es keine signifikante Korrelation zwischen den Zahlen der Immunzellen und der Einnahme von Betablockern, ASS oder ACE Hemmern. Hier ist allerdings anzumerken, dass die vergleichsweise geringe Zahl an Patienten eine Korrelation der klinischen Daten mit den morphologischen Ergebnissen unwahrscheinlich macht. Auch haben wir ja bezüglich der klinischen Daten keine Kontrollgruppe, sodass hier der Nachweis von Korrelationen eher unwahrscheinlich ist.

Umso erstaunter waren wir, dass wir eine einzige signifikante Korrelation zwischen klinischen Daten und den morphologischen Ergebnissen gefunden haben. Es fiel auf, dass signifikant mehr Tregs in den Proben von Patienten mit einer Statintherapie zu finden waren als bei Patienten ohne Statintherapie ($p=0,04$). Beim Vergleich der DCs bei Patienten mit und ohne Statintherapie wurde gezeigt, dass signifikant weniger DCs bei Patienten mit Statintherapie in den Plaques gefunden wurden als bei Patienten ohne Statintherapie. Sowohl für den Marker Fascin ($p=0,006$) als auch für CD83 ($p=0,04$) ergaben sich signifikante Ergebnisse (Tab. 6). Diese Ergebnisse sind untereinander alle kongruent und könnten darauf hinweisen, dass eine Statintherapie die Zahl proinflammatorischer Zellen vermindert und die Zahl antiinflammatorischer Zellen erhöht.

| | Median der Zellen in Plaques bei Patienten mit Statintherapie | 25-75% CI | Median der Zellen in Plaques bei Patienten ohne Statintherapie | 25-75% CI | <i>p-Wert</i> |
|---------------|--|------------------|---|------------------|---------------|
| FoxP3 | 22.7 | 11.4-35.5 | 8.8 | 2.8-15.1 | $p=0.04$ |
| Fascin | 42.2 | 12.3-67.4 | 89.2 | 57-108.5 | $p=0.006$ |
| CD83 | 24.5 | 7-56.5 | 87.2 | 31.5-96.5 | $p=0.04$ |

Tab. 6: Vergleich der Zahl der Immunzellen in Plaques bei Patienten mit und ohne Statintherapie.

5. Diskussion

Die Atherosklerose ist von großer klinischer und sozioökonomischer Bedeutung, da diese zu Myokardinfarkten oder Schlaganfällen führt, die hauptverantwortlich für die Mortalität und Morbidität in den industriellen Ländern sind. Die der Atherosklerose zu Grunde liegende Pathogenese wird seit Jahrzehnten erforscht und langsam zeichnet sich ein detailliertes Bild der pathophysiologischen Vorgänge ab. Es ist bekannt, dass es sich bei der Atherosklerose um eine chronische entzündliche Erkrankung der arteriellen Gefäßwand handelt und verschiedene Immunzellen eine wichtige Rolle bei deren Entstehung und Progression spielen (Businaro 2013). In vorausgehenden Arbeiten zeigten Yilmaz et al., dass myeloide DCs in atherosklerotische Läsionen einwandern und dort als antigenpräsentierende Zellen das Fortschreiten der Instabilität der Plaques fördern. Hingegen zeigte sich deren Zellzahl im Blut von Patienten mit KHK wahrscheinlich aufgrund einer erhöhten Rekrutierung und eines erhöhten Verbrauchs vermindert (Yilmaz et al. 2004, Yilmaz et al. 2009, Yilmaz et al. 2006). In einer dieser Studien wurden Makrophagen, mDCs und T-Lymphozyten in atherosklerotischen Plaques untersucht und es wurde eine proinflammatorische und proatherogene Wirkung von mDCs nachgewiesen (Yilmaz et al. 2004). DCs besitzen auch die Fähigkeit, eine antigenspezifische Toleranz in peripheren T-Lymphozyten zu induzieren, sodass letztendlich ein protektiver Einfluss auf die Pathogenese der Atherosklerose noch nicht ausgeschlossen werden konnte (Steinman und Nussenzweig 2002, Hawiger et al. 2001, Kretschmer et al. 2005). Regulatorische T-Zellen haben eine antiinflammatorische Wirkung und es wurde auch gezeigt, dass diese atheroprotektiv wirken (Taleb et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit haben wir deshalb die Frage aufgestellt, inwieweit myeloide DCs mit pro- und antiinflammatorischen T-Zellen interagieren und wie diese in unterschiedlichen Formen der atherosklerotischen Plaques miteinander korrelieren.

Unser Ziel war es in der vorliegenden Studie, die Häufigkeit verschiedener Immunzellen verglichen miteinander und mit der Expression verschiedener funktionell relevanter Proteine zu untersuchen. Entsprechende Ergebnisse könnten uns dann Informationen darüber geben, inwieweit diese Zellen miteinander interagieren. Ein weiteres Ziel war es zu überprüfen, ob bestimmte Vorerkrankungen, Risikofaktoren, Symptome oder die Einnahme bestimmter Medikamente die Stabilisierung oder Destabilisierung der Plaques sowie die Häufigkeit pro- oder antiinflammatorischer Zellen beeinflussen.

In dieser Studie wurden verschiedene Subtypen der DCs analysiert. Wir stellten neben den mDCs im Allgemeinen (Fascin, S100) auch reife (CD83) und unreife (CD209) mDCs sowie pDCs dar (CD123, CD304).

Wir haben in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Fascin+ mDCs signifikant häufiger in instabilen als in stabilen Plaques sowie Kontrollgewebe vorkommen. Auch die Zahl der mit dem Marker S100 markierten mDCs ist in instabilen Atheromen signifikant erhöht im Vergleich zu stabilen Läsionen. Perrins und Bobryshev beschrieben, dass in atherosklerotisch veränderten Arterien die Anzahl der DCs ansteigt, was eine Analogie zu unserem Ergebnis aufweist (Perrins und Bobryshev 2011). Und auch eine frühere Arbeit von Yilmaz et al. zeigte vermehrt DCs in instabilen Plaques im Vergleich zu stabilen (Yilmaz et al. 2004).

Wir haben signifikant mehr reife CD83+ mDCs in instabilen Plaques nachgewiesen als in stabilen Plaques und Kontrollgewebe. Yilmaz et al. zeigten bereits 2004, dass reife CD83+ mDCs in instabilen Läsionen signifikant häufiger zu finden sind als in stabilen (Yilmaz et al. 2004). Auch Dietel et al. wiesen in den Plaqueschultern instabiler Plaques signifikant mehr reife DCs als in stabilen Atheromen nach (Dietel et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Ergebnis auch mit einem Marker für unreife mDCs gezeigt. Die Zahl der detektierten CD209+ mDCs ist signifikant höher in instabilen Läsionen verglichen mit stabilen Plaques und Kontrollgewebe. Es liegt somit nahe, dass unreife mDCs in höherem Maße in die Plaques einwandern. Vermutlich ist zeitgleich auch die Maturation der mDCs erhöht. Neben einer erhöhten Rekrutierung könnte die erhöhte Zahl der DCs in instabilen atherosklerotischen Läsionen durch ein vermehrtes Trapping der Zellen verursacht sein. Dies würde bedeuten, dass die Migration der DCs aus der Gefäßwand in die regionalen Lymphknoten inhibiert ist. Möglich wäre auch ein Zusammenspiel dieser Mechanismen.

Des Weiteren haben wir untersucht, ob auch pDCs eine Rolle in der Entwicklung der atherosklerotischen Plaques spielen. Es wurde gezeigt, dass die Zahl der pDCs nicht signifikant zwischen stabilen und instabilen Läsionen verändert ist, was darauf hinweist, dass diesen Zellen keine besondere Bedeutung bei der entzündlichen Veränderung in der Gefäßwand sowie der Plaqueentstehung zukommt. Jedoch gibt es auch eine Studie, welche die Anwesenheit von pDCs in Atheromen beschreibt. Es wird angegeben, dass pDCs T-Lymphozyten aktivieren können (Niessner et al. 2006). Auch Macritchie et al. zeigten, dass im Mausmodell die Verminderung von pDCs zu stabileren Formen der atherosklerotischen Plaques beiträgt, was für die proatherogene Funktion der pDCs spricht (Macritchie et al. 2012). Dennoch ist unser Ergebnis nicht sehr überraschend, weil auch aus vorhergehenden Arbeiten resultierte, dass pDCs nicht in inflammatorische Bereiche, sondern eher in

lymphatisches Gewebe einwandern (Penna et al. 2002, Pichyangkul et al. 2003). Diese wurden jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, sondern lediglich die Intima der Gefäßwand. Wir können somit nicht ausschließen, dass es zu Veränderungen der Zahl von pDCs im lymphatischen Gewebe der Gefäßwand kommt.

Wir analysierten in dieser Studie auch das Vorkommen des Aktivierungsmarkers HLA-DR in den atherosklerotischen Plaques. Es ergab sich, dass aktivierte DCs signifikant zahlreicher in instabilen Läsionen als in stabilen Plaques und Kontrollgewebe vorkommen. Es wurde somit gezeigt, dass nicht nur das Vorkommen der DCs, sondern auch ihre Aktivität direkt im Atherom mit dem Progress der Atherosklerose signifikant zunimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls verschiedene Subtypen der T-Lymphozyten untersucht. Sowohl die Gesamtzahl der T-Lymphozyten (CD3) in den Läsionen wurde erforscht, als auch die Subtypen T-Helfer-Zellen (CD4) und zytotoxische T-Lymphozyten (CD8) nachgewiesen. Die aktivierten T-Lymphozyten wurden mittels des Markers CD25 in den atherosklerotischen Plaques quantifiziert. T-Lymphozyten (CD3) wurden in instabilen Plaques verglichen mit stabilen Läsionen signifikant häufiger beobachtet. Die Kolo-kalisation von DCs und T-Lymphozyten wird als ein ätiologischer Faktor für die Destabilisierung von atherosklerotischen Plaques vermutet (Perrins und Bobryshev 2011). T-Lymphozyten wurden mit der Destabilisierung von Atheromen in Verbindung gebracht, weil aktivierte T-Lymphozyten in den Plaques ansässige Zellen vernichten könnten, indem sie unter anderem zytotoxische Enzyme wie Perforine und Granzym B ausschütten. Diese wiederum aktivieren intrazelluläre Caspasen, welche Apoptose auslösen. Das Zusammenspiel von T-Lymphozyten und DCs spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung dieser T-Zell-Funktionen. DCs sind in der Lage T-Lymphozyten zu aktivieren, welche wiederum im Plaque ansässige Zellen zerstören und DCs sensitivieren können (Perrins und Bobryshev 2011).

Auch T-Helfer-Zellen (CD4) haben wir in der vorliegenden Arbeit in instabilen atherosklerotischen Läsionen signifikant häufiger nachgewiesen als in stabilen. Ketelhuth und Hansson beschrieben ebenfalls eine mögliche proatherogene Funktion von T-Helfer-Zellen (Ketelhuth und Hansson 2011). Auch Asman et al. merkten an, dass T-Lymphozyten aus dem Blut in atherosklerotische Läsionen einwandern könnten und dort möglicherweise zur Destabilisierung der Plaques führen (Asman et al. 2014). Speziell Th1-Zellen scheinen eine proatherogene Funktion aufzuweisen, welche v.a. durch die Ausschüttung des Faktors IFN γ vermittelt wird (Mallat et al. 2009).

Des Weiteren haben wir eine signifikant höhere Zahl CD8⁺ zytotoxischer T-Lymphozyten in instabilen Plaques gegenüber stabilen Plaques und Kontrollgewebe gezeigt. Die Rolle CD8⁺

zytotoxischer T-Lymphozyten ist noch nicht sehr gut erforscht. Unser Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass auch dieser Subspezies der T-Lymphozyten eine proatherogene Rolle zukommt. Auch die Arbeit von Olofsson et al. resultierte in einer ähnlichen Vermutung, da die Größe einer atherosklerotischen Läsion parallel mit der Anzahl der durch CD137 stimulierten CD8⁺ T-Lymphozyten anstieg (Olofsson et al. 2008).

In dieser Arbeit ergaben sich signifikant mehr NK-Zellen (CD161) in instabilen Atheromen als in stabilen Läsionen und Kontrollgewebe. Zirkulierende NK-Zellen wurden bei Patienten mit ausgeprägter Atherosklerose vermehrt nachgewiesen, was analog zu unseren Ergebnissen auf eine proatherogene Funktion dieser Zellen hinweist (Vanderlaan und Reardon 2005, Bruunsgaard et al. 2001).

Zusätzlich untersuchten wir die Läsionen auf aktivierte T-Lymphozyten mittels des Markers CD25. Wir konnten auch eine signifikante Zunahme dieses Zelltyps in instabilen verglichen mit stabilen Plaques beobachten.

Um den Einfluss von Tregs auf die Entwicklung von Atherosklerose zu untersuchen, wurden Tregs sowohl in Plaques verschiedener Stadien als auch in Kontrollgewebe quantifiziert. Zu den Ergebnissen lässt sich folgendes feststellen: In den Kontrollgefäßen beobachteten wir eine niedrige Zellzahl, welche im Vergleich dazu in stabilen atherosklerotischen Läsionen signifikant angestiegen ist. Im weiteren Progress der Atherosklerose zeigten wir einen signifikanten Abfall der Zahl der Tregs in der Gefäßwand, welche in instabilen Läsionen weniger als ein Drittel im Vergleich zu stabilen Läsionen betrug. Eine Erklärung könnte möglicherweise sein, dass nur wenige inflammatorische Zellen in den gesunden Gefäßen vorhanden sind, da insgesamt wenige Immunzellen in gesunde Gefäße einwandern. Während der beginnenden Atherogenese migrieren Immunzellen in die Gefäßwand und es wird ein signifikanter Anstieg der Tregs in den stabilen Plaques erreicht, um möglicherweise die Entzündungsreaktion und den Progress der Atherosklerose zu limitieren. Der signifikante Abfall dieser antiinflammatorischen Zellen ist als ein Ausdruck der Eskalation der Inflammation zu werten. Die atheroprotektive Rolle der Tregs wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben. Ait-Oufella et al. und Mor et al. zeigten, dass CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs Atherosklerose in LDRD defizienten Mäusen inhibieren können (Mor et al. 2007, Ait-Oufella et al. 2006). Des Weiteren sollen Tregs in den frühen Stadien der Atherosklerose die Bildung neuer Plaques verhindern, in bereits existierenden Läsionen deren Größe reduzieren und Stabilität fördern (Foks et al. 2011). Bisher wurden nach unserem Kenntnisstand nur drei Studien publiziert, welche sich mit der Zahl von FoxP3⁺ Tregs in atherosklerotischen Läsionen befassten (de Boer et al. 2007b, Patel et al. 2010, Dietel et al. 2013).

Interessanterweise haben de Boer et al. ebenfalls Tregs in stabilen und vulnerablen Plaques analysiert und die Zellzahlen in diesen fortgeschrittenen Plaquestadien mit Zellzahlen in initialen Läsionen verglichen. Dabei wurde ein signifikanter Anstieg der Zellzahlen in vulnerablen high-risk-Läsionen im Vergleich zu initialen Plaques beobachtet. Zwischen vulnerablen und fibrotischen, stabilen Läsionen wurde kein signifikanter Unterschied gezeigt (de Boer et al. 2007a). Patel et al. beobachteten höhere Zellzahlen von Tregs bei Patienten mit ischämischen Symptomen im Gegensatz zu asymptomatischen Patienten (Patel et al. 2013). Da die klinischen Daten der eingeschlossenen Patienten ähnlich waren, sind Unterschiede in den Studienprotokollen bei der Zellanalyse eventuell Ursache der Diskrepanz der Ergebnisse zu unserer Arbeit. In der vorliegenden Studie wurden fünf verschiedene Plaqueregionen bei jeder Probe untersucht, während de Boer et al. das Vorkommen von Tregs nur in der Intima oder der Adventitia bei der Analyse berücksichtigten und Patel et al. 20 nicht näher bezeichnete Bereiche der einzelnen Plaques betrachteten. Kürzlich wurde eine Studie publiziert, die unsere Ergebnisse untermauert (Dietel et al. 2013). Dietel et al. zeigten eine niedrigere Anzahl der Tregs in instabilen als in stabilen Plaques sowie eine inverse Korrelation von Tregs mit mDCs. Jedoch nutzte diese Arbeitsgruppe andere Marker um betreffende Zellen darzustellen. Für die Quantifizierung von DCs wurden CD11c und DC-LAMP verwendet. Das macht deutlich, dass die beschriebenen Ergebnisse unabhängig von speziellen Markern sind.

Um die Chemoattraktion als einen möglichen Mechanismus der Einwanderung der Immunzellen zu untersuchen, wurden Chemokinrezeptoren quantifiziert und auf das Vorliegen einer Korrelation von Immunzellen mit Chemokinrezeptoren geprüft. Dabei zeigte sich, dass CCR4 und CCR6 signifikant zahlreicher in instabilen als stabilen Läsionen exprimiert werden. Es ergab sich eine signifikante positive Korrelation zwischen CCR4-Expression und proinflammatorischen T-Lymphozyten (CD3). Eine inverse Korrelation von CCR4-Expression und Tregs wurde nachgewiesen. Dies lässt darauf schließen, dass Chemokinrezeptoren eine wichtige Funktion bei der Einwanderung proinflammatorischer, proatherogener T-Lymphozyten in die atherosklerotischen Läsionen spielen, jedoch nicht antiinflammatorische Zellen in diesem Maß anlocken. Die Expression von Chemokinrezeptoren scheint somit einen proinflammatorischen und proatherogenen Einfluss auf den Prozess der Atherogenese zu nehmen. Auch andere Arbeiten ergaben ähnliche Hinweise. Moreira et al. beschrieben, dass die Hemmung von CCR2 einen atheroprotektiven Effekt bei KHK bewirkt. Dies scheint eine Beobachtung zu sein, die ebenfalls auf eine proatherogene Funktion eines Chemokinrezeptors hinweist (Moreira et al. 2014). Auch CCR7

wurde als ein Chemokinrezeptor, der die Entstehung von Atherosklerose fördert, beschrieben (Cai et al. 2014). Li et al. schrieben in einem aktuellen Review über die Migration von Lymphozyten in atherosklerotische Plaques, dass Chemokinrezeptoren eine wichtige Rolle in dieser einnehmen (Li und Ley 2014).

Des Weiteren wollten wir die Immunzellen nicht nur quantifizieren, sondern auch in den atherosklerotischen Läsionen genau lokalisieren. Wir stellten die Verteilung dieser in den einzelnen Plaqueregionen der verschiedenen Stadien der Läsionen dar. MDCs (Fascin) verteilten sich in den Regionen der Läsionen unabhängig vom Plaquestadium. CD4⁺ T-Helfer-Zellen wanderten mit steigender Instabilität vermehrt in den Lipidkern, die fibröse Kappe und die Plaqueschultern ein. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die aktivierten Formen dieser Zellen an diesen Orten ansässige Zellen zerstören und hier rupturgefährdete Zonen schaffen. Es wurde gezeigt, dass Tregs hauptsächlich in den Lipidkern einwandern. Interessanterweise ist in instabilen Plaques die relative Zellzahl im Lipidkern deutlich höher als in stabilen Plaques, obwohl die absolute Zellzahl deutlich niedriger in allen Plaqueregionen ist. Tregs scheinen also bei der Zunahme der Instabilität vermehrt in den Lipidkern zu migrieren. Sie wandern jedoch bei instabilen Plaques in nur geringem Ausmaß in die Plaqueschultern ein, wobei antiinflammatorische Zellen in diesen Bereichen vermutlich eine wichtige Rolle spielen würden, da diese Plaqueregionen für Ruptur der Läsion anfällig sind (Barlis et al. 2008, Kumar und Balakrishnan 2005).

Um eine eventuelle Interaktion von DCs und (proinflammatorischen) T-Lymphozyten darzustellen, wurden Korrelationsanalysen zwischen diesen Zellreihen durchgeführt. Das Vorkommen Fascin⁺ mDCs korreliert signifikant positiv mit dem Vorkommen der CD4⁺ T-Helfer-Zellen, der CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten und ebenso der CD25⁺ aktivierten T-Lymphozyten. Zudem beobachteten wir eine signifikante positive Korrelation der Fascin⁺ mDCs und der CD161⁺ NK-Zellen. Die Zahl reifer mDCs (CD83) korreliert signifikant positiv mit der Zahl der T-Helfer-Zellen (CD4). Bei den Korrelationsanalysen von unreifen mDCs und T-Lymphozyten ergab sich Folgendes: Unreife mDCs (CD209) korrelieren signifikant positiv mit T-Helfer-Zellen (CD4), zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8) und aktivierten T-Lymphozyten (CD25). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass mDCs T-Lymphozyten in den atherosklerotischen Läsionen aktivieren und sowohl T-Lymphozyten, NK-Zellen als auch mDCs proinflammatorisch und proatherogen wirken. Eine Arbeit von

2005 zeigt ebenfalls einen kombinierten Anstieg von DCs und NK-Zellen bei der Progression von Atheromen (Bobryshev und Lord 2005). Dieses Ergebnis können wir bestätigen. Unsere Beobachtungen sind hinweisend für die Interaktion zwischen reifen mDCs und T-Helfer-Zellen sowie die antigenspezifische Aktivierung der T-Lymphozyten in der Pathogenese atherosklerotischer Läsionen. Dass DCs die aufgenommenen Antigene T-Lymphozyten präsentieren, ist ein bekannter immunologischer Prozess. Perrins et al. beschrieben in einem ausführlichen Review, dass dies auch bei der Pathogenese der Atherosklerose erfolgt. Vor allem mDCs scheinen dabei eine wichtige Rolle zu spielen, indem durch die Ausschüttung von IL-12 T-Lymphozyten aktiviert werden (Perrins und Bobryshev 2011, Han et al. 2008). Unsere Ergebnisse bestärken diese Annahme.

Reife mDCs sind funktionell aktiv. Sie sind dazu befähigt, eine Immunantwort durch die Aktivierung antigenspezifischer T-Lymphozyten auszulösen, während es dafür Hinweise gibt, dass unreife mDCs eher proinflammatorische T-Lymphozyten inhibieren, Tregs stimulieren und somit eine Toleranzentstehung fördern (Lutz und Schuler 2002, Steinman et al. 2003).

Diese Hypothese können wir nicht bestätigen. Der signifikante Anstieg der Zahl unreifer CD209⁺ mDCs in instabilen atherosklerotischen Plaques im Vergleich zu stabilen Plaques und Kontrollgewebe spricht für ihre proinflammatorische Funktion. Auch eine Inhibierung von proinflammatorischen T-Lymphozyten durch CD209⁺ DCs scheint unwahrscheinlich, da wir eine signifikante positive Korrelation zwischen unreifen mDCs (CD209) und T-Helfer-Zellen (CD4), zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8) sowie aktivierten T-Lymphozyten (CD25) nachgewiesen haben. Unreife (CD209⁺) und reife (CD83⁺) mDCs korrelierten signifikant positiv miteinander. Das zeigt, dass sowohl die Zahl unreifer als auch reifer mDCs mit zunehmender Instabilität einer Plaque ansteigen. Es ist ein Hinweis für die vermehrte Einwanderung unreifer mDCs und die steigende Reifung dieser Zellen im Atherom.

Des Weiteren haben wir eine signifikante positive Korrelation zwischen Fascin⁺ mDCs und aktivierten HLA-DR⁺ DCs beobachtet. Auch die mit dem Marker S100 detektierten mDCs korrelierten signifikant positiv mit aktivierten HLA-DR⁺ DCs. Mit steigender Anzahl der mDCs erhöht sich in den Plaques auch die Zahl der aktivierten mDCs, welche vor Ort wiederum T-Lymphozyten aktivieren könnten. Wir haben zudem Subtypen von T-Lymphozyten wie T-Helfer-Zellen, zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen auf Korrelation untereinander überprüft. Das Vorkommen CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in atherosklerotischen Läsionen korreliert signifikant positiv mit einem hohen Korrelationskoeffizienten. Beide Subtypen wandern mit steigender Instabilität der

atherosklerotischen Läsionen vermehrt in diese ein. Dieses Ergebnis weist auf die proinflammatorische Funktion beider Zellreihen hin.

Es ergab sich außerdem eine signifikante positive Korrelation zwischen in den Plaques vorkommenden aktivierten T-Lymphozyten (CD25) und allen für die Detektion von mDCs verwendeten Markern (Fascin, S100, CD83, CD209). Dies ist ein Hinweis darauf, dass DCs in der Lage sein können, T-Lymphozyten in der atherosklerotischen Läsion in den aktivierten Zustand zu versetzen.

Des Weiteren beobachteten wir eine signifikante positive Korrelation zwischen HLA-DR+ Zellen und CD25+ Zellen. Wir haben gezeigt, dass die Aktivierung von DCs mit aktivierten T-Lymphozyten im Atherom korreliert. Das legt nahe, dass aktivierte DCs T-Lymphozyten aktivieren und so eine inflammatorische Kaskade in den Plaques hervorrufen. Ähnliche Ergebnisse erhielten auch andere Autoren, welche die Wirkung von DCs und T-Lymphozyten bei anderen Erkrankungen, wie z.B. Psoriasis untersuchten (Fujita et al. 2011). Es wurde durch mehrere Arbeitsgruppen eine Aktivierung von T-Lymphozyten durch DCs in unterschiedlichen Versuchen beschrieben (Fujita et al. 2011, Fan et al. 2012, Perrins und Bobryshev 2011, Wojas und Pajtasz-Piasecka 2010).

Um ein mögliches Zusammenspiel von DCs und (anti-inflammatorischen) T-Lymphozyten zu untersuchen, wurden folgende DC-Marker mit Tregs in Korrelationsanalysen verglichen. Sowohl reife (CD83) als auch unreife DCs (CD209) korrelierten in unserer Arbeit signifikant invers mit antiatherogenen Tregs. Das ergab auch die Studie von Dietel et al., in welcher eine inverse Korrelation von Fascin+ mDCs und Tregs gezeigt wurde (Dietel et al. 2013). Foks et al. beschrieben, dass Tregs T-Lymphozyten supprimieren, antinflammatorische Makrophagen induzieren, die Bildung von Schaumzellen hemmen und einen Einfluss auf den Cholesterinstoffwechsel haben (Foks et al. 2014). Die positive Korrelation mit proinflammatorischen Zellen und die negative Korrelation mit Tregs könnten ein weiterer Hinweis darauf sein, dass DCs proinflammatorische T-Lymphozyten aktivieren und gleichzeitig Tregs in atherosklerotischen Läsionen supprimieren. In diesem Sinne ist gleich zweifach eine proatherogene Wirkung von DCs anzunehmen: Über die Förderung der Inflammation und die Hemmung der Antiinflammation. Neben der Hypothese, dass DCs Tregs hemmen könnten, wurde auch eine mögliche Hemmung der antigenpräsentierenden Funktion der DCs durch Tregs aufgezeigt. Chistiakov et al. beschrieben, dass Tregs an unreife DCs binden könnten und Signalwege beeinflussen, wodurch proinflammatorische Stimuli auf T-Lymphozyten unterdrückt werden (Chistiakov et al. 2013). Außerdem sezernieren Tregs

Zytokine, durch welche ebenfalls eine Inaktivierung von DCs möglich ist (Ait-Oufella et al. 2009).

Es wurde weiterhin eine signifikante inverse Korrelation zwischen Tregs und CD4⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen. Chistiakov et al. und Sasaki et al. beschrieben, dass Tregs die Proliferation von T-Lymphozyten sowie deren Umwandlung in Th1-, Th2- und Th17-Zellen und die Aktivierung polyklonaler T-Lymphozyten hemmen. CD4⁺ T-Lymphozyten werden durch Tregs laut diesen Autoren supprimiert, was mit unserem Ergebnis übereinkommt (Chistiakov et al. 2013, Sasaki et al. 2012). Auch Ait-Oufella et al. erklärten, dass aktivierte Tregs Effektor-T-Lymphozyten supprimieren und sogar Apoptose auslösen können (Ait-Oufella et al. 2009). Diese Prozesse potenzieren den proinflammatorischen Verlauf. Dies erklärt auch sehr gut, die von uns beobachtete inverse Korrelation von CD4⁺ T-Lymphozyten und Tregs.

Betrachtet man die klinischen Daten der Patienten der vorliegenden Studie, so zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Zellzahlen der untersuchten Zellen bei Plaques von Patienten mit Risikofaktoren wie Hypertonie, Diabetes und Hyperlipidämie verglichen mit den Proben von Patienten ohne die genannten Erkrankungen. Allerdings war die Prävalenz der Risikofaktoren sehr hoch und meist waren auch mehrere dieser gleichzeitig im Sinne eines metabolischen Syndroms vorhanden, sodass die Aussagekraft zu diesem Aspekt eingeschränkt ist. Im Gegensatz zu früheren Ergebnissen (Yilmaz et al. 2004) ergab sich aktuell auch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Zahl der untersuchten Immunzellen und akuten ischämischen Symptomen. Der Grund für diese Unterschiede ist eventuell der in der Arbeit erfolgte Einschluss von Proben aus Femoralarterien neben Carotisplaques. Patienten mit pAVK leiden vermehrt an chronischen Schmerzen und seltener an akuten ischämischen Gefäßverschlüssen. Auch die geringe Patientenzahl in unserer Arbeit könnte hier eine Rolle spielen. Interessanterweise gibt es eine signifikante Assoziation zwischen Fascin⁺ mDCs, CD83⁺ mDCs, Tregs und dem Vorhandensein einer Statintherapie. Bei mit Statinen behandelten Patienten wurden in der Gefäßwand atherosklerotischer Läsionen signifikant weniger mDCs und mehr Tregs nachgewiesen als bei Proben von nicht behandelten Patienten. Außerdem wurde gezeigt, dass deutlich mehr Studienteilnehmer, denen stabile Plaques entnommen wurden, Statine einnehmen als Patienten mit instabilen Plaques. Diese Ergebnisse unterstützen die in mehreren Studien beschriebene Hypothese, dass Statine eine stabilisierende, antiinflammatorische und antiatherogene Wirkung haben (Crisby et al. 2001, Mausner-Fainberg et al. 2008, Kofler et al. 2008, Zeb et al. 2013). Mausner-

Fainberg et al. haben gezeigt, dass eine Therapie mit bestimmten Statinen die Zahl zirkulierender Tregs beim Menschen erhöht (Mausner-Fainberg et al. 2008). Insgesamt betrachtet harmonieren diese Ergebnisse logisch miteinander. Eine Erklärung könnte sein, dass die Statine durch einen noch unbekannten Mechanismus Tregs stimulieren. Es sind sowohl zirkulierende Tregs bei mit Statinen behandelten Patienten erhöht, als auch die Zahl der Tregs in den Gefäßwänden. Diese scheinen ihre antiinflammatorische Funktion auszuüben, wodurch es letztendlich zur Stabilität der Plaques kommen könnte. Meng et al. zeigten auch im Mausmodell eine Induktion von Tregs durch Statintherapie (Meng et al. 2012).

6. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie wurden signifikant mehr proinflammatorische Zellen wie mDCs, Makrophagen und proinflammatorische T-Lymphozyten in instabilen als in stabilen Plaques von Atheromen nachgewiesen. Des Weiteren wurde auch eine höhere Expression von CD25 und HLA-DR signifikant häufiger in instabilen Läsionen als in stabilen Läsionen beobachtet. Auch Chemokinrezeptoren, welche für die Einwanderung inflammatorischer Immunzellen verantwortlich sind, fanden wir signifikant häufiger in instabilen als stabilen Plaques. Die vorliegende Studie ist eine der ersten Arbeiten, die signifikant niedrigere Zellzahlen von Tregs in instabilen als in stabilen Atheromen zeigt. Diese Verminderung antiinflammatorischer Zellen während der Atherogenese könnte einen Grund für die Destabilisierung der Plaques durch eine inflammatorische Reaktion darstellen. Eine Zunahme an mDCs in instabilen Plaques ist möglicherweise auch die Ursache für die Reduktion an Tregs.

Gegenstand zukünftiger Studien könnte es sein, zu untersuchen, ob durch eine gezielte Einflussnahme auf die Funktion von Tregs sich der Verlauf der Atherosklerose modulieren lässt. Die Zahl inflammatorischer Zellen in den Läsionen ließe sich auch durch eine bewusste Beeinflussung der zugehörigen Chemokinrezeptoren regulieren. Mittels einer zielgerichteten Erhöhung der Produktion bestimmter antiinflammatorischer Zytokine ließe sich möglicherweise der Verlauf der Atherogenese beeinflussen. Eine maßgeschneiderte Immunmodulation könnte in einer nahen Zukunft ein neues therapeutisches Konzept darstellen, um die Atherosklerose zu stabilisieren und damit das Auftreten von ischämischen Ereignissen wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall zu vermeiden.

7. Literaturverzeichnis

- Abd Alla J, Langer A, Elzahwy SS, Arman-Kalcek G, Streichert T, Quitterer U. 2010. Angiotensin-converting enzyme inhibition down-regulates the pro-atherogenic chemokine receptor 9 (CCR9)-chemokine ligand 25 (CCL25) axis. *J Biol Chem*, 285 (30):23496-23505.
- Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. 2009. Cytokine network and T cell immunity in atherosclerosis. *Semin Immunopathol*, 31 (1):23-33.
- Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J, Merval R, Esposito B, Cohen JL, Fisson S, Flavell RA, Hansson GK, Klatzmann D, Tedgui A, Mallat Z. 2006. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med*, 12 (2):178-180.
- Amann. 2012. Kursbuch Doppler- und Duplexsonografie.
- Andersson J, Libby P, Hansson GK. 2010. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol*, 134 (1):33-46.
- Asman A, Chouraqui P, Marcu-Malina V, Matetzky S, Segev A, Fefer P, Agranat O, Koltakov A, Hod H, Livneh A, Bank I. 2014. Acute coronary syndromes are associated with a reduction of VLA-1+ peripheral blood T cells and their enrichment in coronary artery plaque aspirates. *Immunobiology*, 219 (4):302-307.
- Asselin-Paturel C, Trinchieri G. 2005. Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *J Exp Med*, 202 (4):461-465.
- Balzer K, Rümenapf G. 2008. Leitlinie Erkrankungen der Oberschenkelarterien Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie (vaskuläre und endovaskuläre Chirurgie) (DGG)
- Barlis P, Serruys PW, Devries A, Regar E. 2008. Optical coherence tomography assessment of vulnerable plaque rupture: predilection for the plaque 'shoulder'. *Eur Heart J*, 29 (16):2023.
- Bobryshev YV. 2010. Dendritic cells and their role in atherogenesis. *Lab Invest*, 90 (7):970-984.
- Bobryshev YV, Lord RS. 1995. Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of Vascular Dendritic Cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta. *Arch Histol Cytol*, 58 (3):307-322.
- Bobryshev YV, Lord RS. 2005. Co-accumulation of dendritic cells and natural killer T cells within rupture-prone regions in human atherosclerotic plaques. *J Histochem Cytochem*, 53 (6):781-785.
- Brunnsgaard H, Pedersen AN, Schroll M, Skinhoj P, Pedersen BK. 2001. Decreased natural killer cell activity is associated with atherosclerosis in elderly humans. *Exp Gerontol*, 37 (1):127-136.
- Bundesamt S. 2014. Todesursachen in Deutschland.4.
- Businaro R. 2013. Neuroimmunology of the atherosclerotic plaque: a morphological approach. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8 (1):15-27.
- Cai W, Tao J, Zhang X, Tian X, Liu T, Feng X, Bai J, Yan C, Han Y. 2014. Contribution of homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 and their receptor CCR7 to coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34 (9):1933-1941.
- Caligiuri G, Rudling M, Ollivier V, Jacob MP, Michel JB, Hansson GK, Nicoletti A. 2003. Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice. *Mol Med*, 9 (1-2):10-17.
- Chen XQ, Liu XF, Liu WH, Guo W, Yu Q, Wang CY. 2013. Comparative analysis of dendritic cell numbers and subsets between smoking and control subjects in the peripheral blood. *Int J Clin Exp Pathol*, 6 (2):290-296.
- Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN. 2013. Regulatory T cells in atherosclerosis and strategies to induce the endogenous atheroprotective immune response. *Immunol Lett*, 151 (1-2):10-22.
- Chiu JJ, Chien S. 2011. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev*, 91 (1):327-387.
- Choi JH, Cheong C, Dandamudi DB, Park CG, Rodriguez A, Mehandru S, Velinzon K, Jung IH, Yoo JY, Oh GT, Steinman RM. 2011. Flt3 signaling-dependent dendritic cells protect against atherosclerosis. *Immunity*, 35 (5):819-831.
- Cobbold SP, Castejon R, Adams E, Zelenika D, Graca L, Humm S, Waldmann H. 2004. Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol*, 172 (10):6003-6010.
- Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. 2001. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation*, 103 (7):926-933.
- Crowther MA. 2005. Pathogenesis of atherosclerosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:436-441.

- Davenport P, Tipping PG. 2003. The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol*, 163 (3):1117-1125.
- Davies MJ, Woolf N. 1993. Atherosclerosis: what is it and why does it occur? *Br Heart J*, 69 (1 Suppl):S3-11.
- de Boer OJ, van der Meer JJ, Teeling P, van der Loos CM, van der Wal AC. 2007a. Low numbers of FOXP3 positive regulatory T cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions. *PLoS One*, 2 (8):e779.
- de Boer OJ, van der Meer JJ, Teeling P, van der Loos CM, van der Wal AC. 2007b. Low numbers of FOXP3 positive regulatory T cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions. *PLoS One*, 2 (1):e779.
- de Weerd M, Greving JP, Hedblad B, Lorenz MW, Mathiesen EB, O'Leary DH, Rosvall M, Sitzer M, Buskens E, Bots ML. 2010. Prevalence of asymptomatic carotid artery stenosis in the general population: an individual participant data meta-analysis. *Stroke*, 41 (6):1294-1297.
- Debus EST, G. ; Schmitz-Rixen, T.; Flessenkämper, I.; Storck, M.; Wenk, H.; Grundmann, R.T. . 2013. Ursachen und Risikofaktoren der Arteriosklerose. *Gefäßchirurgie* 2013/6:544-550
- Dietel B, Cicha I, Voskens CJ, Verhoeven E, Achenbach S, Garlichs CD. 2013. Decreased numbers of regulatory T cells are associated with human atherosclerotic lesion vulnerability and inversely correlate with infiltrated mature dendritic cells. *Atherosclerosis*, 230 (1):92-99.
- Eckstein H-H, Kühnl A, Berkefeld J, Diel R, Dörfler A, Kopp I, Langhoff R, Lawall H, Ringleb P, Sander D, Storck M. 2012. S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der extracraniellen Carotisstenose
- Elhage R, Gourdy P, Bouchet L, Jawien J, Fouque MJ, Fievet C, Huc X, Barreira Y, Couloumiers JC, Arnal JF, Bayard F. 2004. Deleting TCR alpha beta+ or CD4+ T lymphocytes leads to opposite effects on site-specific atherosclerosis in female apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol*, 165 (6):2013-2018.
- Fan X, Ye M, Xue B, Ke Y, Wong CK, Xie Y. 2012. Human dendritic cells engineered to secrete interleukin-18 activate MAGE-A3-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro. *Immunol Invest*, 41 (5):469-483.
- Foks AC, Lichtman AH, Kuiper J. 2014. Treating Atherosclerosis With Regulatory T Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.
- Foks AC, Frodermann V, ter Borg M, Habets KL, Bot I, Zhao Y, van Eck M, van Berkel TJ, Kuiper J, van Puijvelde GH. 2011. Differential effects of regulatory T cells on the initiation and regression of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 218 (1):53-60.
- Förster PDDmR 19.04.2013. http://www.dr-r-foerster.de/cms/front_content.php?idcatart=21&lang=1&client=1
- Frantz S, Vincent KA, Feron O, Kelly RA. 2005. Innate immunity and angiogenesis. *Circ Res*, 96 (1):15-26.
- Fuhrman B, Partoush A, Volkova N, Aviram M. 2008. Ox-LDL induces monocyte-to-macrophage differentiation in vivo: Possible role for the macrophage colony stimulating factor receptor (M-CSF-R). *Atherosclerosis*, 196 (2):598-607.
- Fujita H, Shemer A, Suarez-Farinas M, Johnson-Huang LM, Tintle S, Cardinale I, Fuentes-Duculan J, Novitskaya I, Carucci JA, Krueger JG, Guttman-Yassky E. 2011. Lesional dendritic cells in patients with chronic atopic dermatitis and psoriasis exhibit parallel ability to activate T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol*, 128 (3):574-582 e571-512.
- Galkina E, Ley K. 2009. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol*, 27:165-197.
- George J, Schwartzberg S, Medvedovsky D, Jonas M, Charach G, Afek A, Shamiss A. 2012. Regulatory T cells and IL-10 levels are reduced in patients with vulnerable coronary plaques. *Atherosclerosis*, 222 (2):519-523.
- Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. 2013. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol*, 22 (1):9-15.
- Granelli-Piperno A, Pritsker A, Pack M, Shimeliovich I, Arrighi JF, Park CG, Trumpfheller C, Piguet V, Moran TM, Steinman RM. 2005. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *J Immunol*, 175 (7):4265-4273.
- Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. 1998. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*, 2 (2):275-281.
- Haigh K, Bingley J, Golledge J, Walker PJ. 2013. Peripheral arterial disease - screening in general practice. *Aust Fam Physician*, 42 (6):391-395.
- Han JW, Shimada K, Ma-Krupa W, Johnson TL, Nerem RM, Goronzy JJ, Weyand CM. 2008. Vessel wall-embedded dendritic cells induce T-cell autoreactivity and initiate vascular inflammation. *Circ Res*, 102 (5):546-553.
- Hansson GK, Holm J, Jonasson L. 1989. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol*, 135 (1):169-175.

- Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC. 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*, 194 (6):769-779.
- Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, Hiratzka LF, Murphy WR, Olin JW, Puschett JB, Rosenfield KA, Sacks D, Stanley JC, Taylor LM, Jr., White CJ, White J, White RA, Antman EM, Smith SC, Jr., Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Gibbons RJ, Hunt SA, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, American Association for Vascular S, Society for Vascular S, Society for Cardiovascular A, Interventions, Society for Vascular M, Biology, Society of Interventional R, Disease AATFoPGWCtDGftMoPWPA, American Association of C, Pulmonary R, National Heart L, Blood I, Society for Vascular N, TransAtlantic Inter-Society C, Vascular Disease F. 2006. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation*, 113 (11):e463-654.
- Huber SA, Sakkinen P, David C, Newell MK, Tracy RP. 2001. T helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia. *Circulation*, 103 (21):2610-2616.
- Ilhan F, Kalkanli ST. 2015. Atherosclerosis and the role of immune cells. *World J Clin Cases*, 3 (4):345-352.
- Jashari F, Ibrahim P, Nicoll R, Bajraktari G, Wester P, Henein MY. 2013. Coronary and carotid atherosclerosis: Similarities and differences. *Atherosclerosis*, 227 (2):193-200.
- Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. 1986. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*, 6 (2):131-138.
- Ketelhuth DF, Hansson GK. 2011. Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: break of tolerance in the artery wall. *Thromb Haemost*, 106 (5):779-786.
- King VL, Szilvassy SJ, Daugherty A. 2002. Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL receptor-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22 (3):456-461.
- King VL, Cassis LA, Daugherty A. 2007. Interleukin-4 does not influence development of hypercholesterolemia or angiotensin II-induced atherosclerotic lesions in mice. *Am J Pathol*, 171 (6):2040-2047.
- Klingenberg R, Gerdes N, Badeau RM, Gistera A, Strodthoff D, Ketelhuth DF, Lundberg AM, Rudling M, Nilsson SK, Olivecrona G, Zoller S, Lohmann C, Luscher TF, Jauhiainen M, Sparwasser T, Hansson GK. 2013. Depletion of FOXP3+ regulatory T cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Clin Invest*, 123 (3):1323-1334.
- Kockx MM, Cromheeke KM, Knaapen MW, Bosmans JM, De Meyer GR, Herman AG, Bult H. 2003. Phagocytosis and macrophage activation associated with hemorrhagic microvessels in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23 (3):440-446.
- Kofler S, Schlichting C, Jankl S, Nickel T, Weis M. 2008. Dual mode of HMG-CoA reductase inhibition on dendritic cell invasion. *Atherosclerosis*, 197 (1):105-110.
- Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*, 6 (12):1219-1227.
- Kulkarni AB, Karlsson S. 1993. Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am J Pathol*, 143 (1):3-9.
- Kumar RK, Balakrishnan KR. 2005. Influence of lumen shape and vessel geometry on plaque stresses: possible role in the increased vulnerability of a remodelled vessel and the "shoulder" of a plaque. *Heart*, 91 (11):1459-1465.
- Kurano M, Tsukamoto K. 2011. [Etiology of atherosclerosis-- special reference to bacterial infection and viral infection]. *Nihon Rinsho*, 69 (1):25-29.
- Lee I, Wang L, Wells AD, Dorf ME, Ozkaynak E, Hancock WW. 2005. Recruitment of Foxp3+ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *J Exp Med*, 201 (7):1037-1044.
- Legein B, Temmerman L, Biessen EA, Lutgens E. 2013. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci*, 70 (20):3847-3869.
- Levi M, van der Poll T, Schultz M. 2012. Infection and inflammation as risk factors for thrombosis and atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost*, 38 (5):506-514.
- Li J, Ley K. 2014. Lymphocyte Migration into Atherosclerotic Plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.
- Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. 2006. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity*, 25 (3):455-471.

- Liapis C, Kakisis J, Papavassiliou V, Ntanou A, Kontopoulou S, Kaperonis E, Koumakis K, Gogas J. 2000. Internal carotid artery stenosis: rate of progression. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 19 (2):111-117.
- Libby P. 2006. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr*, 83 (2):456S-460S.
- Libby P. 2008. The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Intern Med*, 263 (5):517-527.
- Libby P. 2009. Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Lipid Res*, 50 Suppl:S352-357.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473 (7347):317-325.
- Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. 2010. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J*, 74 (2):213-220.
- Lim S, Despres JP, Koh KK. 2011. Prevention of atherosclerosis in overweight/obese patients. - In need of novel multi-targeted approaches. *Circ J*, 75 (5):1019-1027.
- Luchtefeld M, Grothausen C, Gagalick A, Jagavelu K, Schuett H, Tietge UJ, Pabst O, Grote K, Drexler H, Forster R, Schieffer B. 2010. Chemokine receptor 7 knockout attenuates atherosclerotic plaque development. *Circulation*, 122 (16):1621-1628.
- Lusis AJ. 2000. Atherosclerosis. *Nature*, 407 (6801):233-241.
- Lutz MB, Schuler G. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*, 23 (9):445-449.
- Macritchie N, Grassia G, Sabir SR, Maddaluno M, Welsh P, Sattar N, Ialenti A, Kurowska-Stolarska M, McInnes IB, Brewer JM, Garside P, Maffia P. 2012. Plasmacytoid dendritic cells play a key role in promoting atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32 (11):2569-2579.
- Mallat Z, Taleb S, Ait-Oufella H, Tedgui A. 2009. The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *J Lipid Res*, 50 Suppl:S364-369.
- Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, Soubrier F, Esposito B, Duez H, Fievet C, Staels B, Duverger N, Scherman D, Tedgui A. 1999. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res*, 85 (8):e17-24.
- Mausner-Fainberg K, Luboshits G, Mor A, Maysel-Auslender S, Rubinstein A, Keren G, George J. 2008. The effect of HMG-CoA reductase inhibitors on naturally occurring CD4+CD25+ T cells. *Atherosclerosis*, 197 (2):829-839.
- McDermott MM, Liu K, Carr J, Criqui MH, Tian L, Li D, Ferrucci L, Guralnik JM, Kramer CM, Yuan C, Kibbe M, Pearce WH, Berry J, McCarthy W, Liao Y, Xu D, Orozco J, Carroll TJ. 2011. Superficial femoral artery plaque, the ankle-brachial index, and leg symptoms in peripheral arterial disease: the walking and leg circulation study (WALCS) III. *Circ Cardiovasc Imaging*, 4 (3):246-252.
- Meng X, Zhang K, Li J, Dong M, Yang J, An G, Qin W, Gao F, Zhang C, Zhang Y. 2012. Statins induce the accumulation of regulatory T cells in atherosclerotic plaque. *Mol Med*, 18:598-605.
- Millonig G, Malcom GT, Wick G. 2002. Early inflammatory-immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY)-study. *Atherosclerosis*, 160 (2):441-448.
- Mor A, Luboshits G, Planer D, Keren G, George J. 2006. Altered status of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with acute coronary syndromes. *Eur Heart J*, 27 (21):2530-2537.
- Mor A, Planer D, Luboshits G, Afek A, Metzger S, Chajek-Shaul T, Keren G, George J. 2007. Role of naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27 (4):893-900.
- Moreira DM, da Silva RL, Vieira JL, Fattah T, Lueneberg ME, Gottschall CA. 2014. Role of Vascular Inflammation in Coronary Artery Disease: Potential of Anti-inflammatory Drugs in the Prevention of Atherothrombosis : Inflammation and Anti-Inflammatory Drugs in Coronary Artery Disease. *Am J Cardiovasc Drugs*.
- Moreno PR, Purushothaman KR, Sirol M, Levy AP, Fuster V. 2006. Neovascularization in human atherosclerosis. *Circulation*, 113 (18):2245-2252.
- Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Truszczyńska H, Sharma SK, Badimon JJ, O'Connor WN. 2004. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation*, 110 (14):2032-2038.
- Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H. 2012. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr*, 23 (4):222-231.
- Nickel T, Schmauss D, Hanssen H, Sicic Z, Krebs B, Jankl S, Summo C, Fraunberger P, Walli AK, Pfeiler S, Weis M. 2009. oxLDL uptake by dendritic cells induces upregulation of scavenger-receptors, maturation and differentiation. *Atherosclerosis*, 205 (2):442-450.
- Niessner A, Sato K, Chaikof EL, Colmegna I, Goronzy JJ, Weyand CM. 2006. Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha. *Circulation*, 114 (23):2482-2489.

- Nizzoli G, Krietsch J, Weick A, Steinfeld S, Facciotti F, Gruarin P, Bianco A, Steckel B, Moro M, Crosti M, Romagnani C, Stolzel K, Torretta S, Pignataro L, Scheibenbogen C, Neddermann P, De Francesco R, Abrignani S, Geginat J. 2013. Human CD1c⁺ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood*, 122 (6):932-942.
- North S, Moenner M, Bikfalvi A. 2005. Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors. *Cancer Lett*, 218 (1):1-14.
- Olofsson PS, Soderstrom LA, Wagsater D, Sheikine Y, Ocaya P, Lang F, Rabu C, Chen L, Rudling M, Aukrust P, Hedin U, Paulsson-Berne G, Sirsjo A, Hansson GK. 2008. CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice. *Circulation*, 117 (10):1292-1301.
- Palinski W, Napoli C. 1999. Pathophysiological events during pregnancy influence the development of atherosclerosis in humans. *Trends Cardiovasc Med*, 9 (7):205-214.
- Patel J, Channon KM, McNeill E. 2013. The downstream regulation of chemokine receptor signalling: implications for atherosclerosis. *Mediators Inflamm*, 2013:459520.
- Patel S, Chung SH, White G, Bao S, Celermajer DS. 2010. The "atheroprotective" mediators apolipoprotein A-I and Foxp3 are over-abundant in unstable carotid plaques. *Int J Cardiol*, 145 (2):183-187.
- Penna G, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. 2002. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol*, 63 (12):1164-1171.
- Perrins CJ, Bobryshev YV. 2011. Current advances in understanding of immunopathology of atherosclerosis. *Virchows Arch*, 458 (2):117-123.
- Pichyangkul S, Endy TP, Kalayanarooj S, Nisalak A, Yongvanitchit K, Green S, Rothman AL, Ennis FA, Libraty DH. 2003. A blunted blood plasmacytoid dendritic cell response to an acute systemic viral infection is associated with increased disease severity. *J Immunol*, 171 (10):5571-5578.
- Pinderski Oslund LJ, Hedrick CC, Olvera T, Hagenbaugh A, Territo M, Berliner JA, Fyfe AI. 1999. Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19 (12):2847-2853.
- Potteaux S, Combadiere C, Esposito B, Casanova S, Merval R, Ardouin P, Gao JL, Murphy PM, Tedgui A, Mallat Z. 2005. Chemokine receptor CCR1 disruption in bone marrow cells enhances atherosclerotic lesion development and inflammation in mice. *Mol Med*, 11 (1-12):16-20.
- Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sanchez S. 2008. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol*, 26:293-316.
- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, Carnethon MR, Dai S, de Simone G, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Greenlund KJ, Hailpern SM, Heit JA, Ho PM, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McDermott MM, Meigs JB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Rosamond WD, Sorlie PD, Stafford RS, Turan TN, Turner MB, Wong ND, Wylie-Rosett J, American Heart Association Statistics C, Stroke Statistics S. 2011. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 123 (4):e18-e209.
- Santos MG, Pegoraro M, Sandrini F, Macuco EC. 2008. Risk factors for the development of atherosclerosis in childhood and adolescence. *Arq Bras Cardiol*, 90 (4):276-283.
- Sasaki N, Yamashita T, Takeda M, Hirata K. 2012. Regulatory T cells in atherogenesis. *J Atheroscler Thromb*, 19 (6):503-515.
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, et al. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 359 (6397):693-699.
- Singh SP, Zhang HH, Foley JF, Hedrick MN, Farber JM. 2008. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J Immunol*, 180 (1):214-221.
- Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 92 (5):1355-1374.
- Steinman RM, Nussenzweig MC. 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (1):351-358.
- Steinman RM, Hawiger D, Liu K, Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Iyoda T, Ravetch J, Dhodapkar M, Inaba K, Nussenzweig M. 2003. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci*, 987:15-25.
- Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. 2010. Adaptive T cell immune responses and atherogenesis. *Curr Opin Pharmacol*, 10 (2):197-202.
- Tano JY, Lee RH, Vazquez G. 2012. Macrophage function in atherosclerosis: potential roles of TRP channels. *Channels (Austin)*, 6 (3):141-148.
- Tedgui A, Mallat Z. 2006. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*, 86 (2):515-581.

- Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E, Ziada KM, Hobbs RE, McCarthy PM, Young JB, Nissen SE. 2001. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation*, 103 (22):2705-2710.
- van Es T, van Puijvelde GH, Foks AC, Habets KL, Bot I, Gilboa E, Van Berkel TJ, Kuiper J. 2010. Vaccination against Foxp3(+) regulatory T cells aggravates atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 209 (1):74-80.
- van Spruel AB, de Jong EC. 2013. Dendritic cell science: more than 40 years of history. *J Leukoc Biol*, 93 (1):33-38.
- Van Vre EA, Van Brussel I, Bosmans JM, Vrints CJ, Bult H. 2011. Dendritic cells in human atherosclerosis: from circulation to atherosclerotic plaques. *Mediators Inflamm*, 2011:941396.
- Vanderlaan PA, Reardon CA. 2005. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. The unusual suspects: an overview of the minor leukocyte populations in atherosclerosis. *J Lipid Res*, 46 (5):829-838.
- Wan W, Murphy PM. 2011. Regulation of atherogenesis by chemokine receptor CCR6. *Trends Cardiovasc Med*, 21 (5):140-144.
- Weber C, Noels H. 2011. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*, 17 (11):1410-1422.
- Weber C, Meiler S, Doring Y, Koch M, Drechsler M, Megens RT, Rowinska Z, Bidzhekov K, Fecher C, Ribechini E, van Zandvoort MA, Binder CJ, Jelinek I, Hristov M, Boon L, Jung S, Korn T, Lutz MB, Forster I, Zenke M, Hieronymus T, Junt T, Zernecke A. 2011. CCL17-expressing dendritic cells drive atherosclerosis by restraining regulatory T cell homeostasis in mice. *J Clin Invest*, 121 (7):2898-2910.
- White GE, Iqbal AJ, Greaves DR. 2013. CC chemokine receptors and chronic inflammation--therapeutic opportunities and pharmacological challenges. *Pharmacol Rev*, 65 (1):47-89.
- Whitman SC, Ravisankar P, Elam H, Daugherty A. 2000. Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. *Am J Pathol*, 157 (6):1819-1824.
- WHO. 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
- Wojas J, Pajtasz-Piasecka E. 2010. [Dendritic cell-regulatory T-cell interaction]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 64:167-174.
- Wolfs IM, Donners MM, de Winther MP. 2011. Differentiation factors and cytokines in the atherosclerotic plaque micro-environment as a trigger for macrophage polarisation. *Thromb Haemost*, 106 (5):763-771.
- Yamashiro S, Yamakita Y, Ono S, Matsumura F. 1998. Fascin, an actin-bundling protein, induces membrane protrusions and increases cell motility of epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 9 (5):993-1006.
- Yilmaz A, Weber J, Cicha I, Stumpf C, Klein M, Raithel D, Daniel WG, Garlich CD. 2006. Decrease in circulating myeloid dendritic cell precursors in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 48 (1):70-80.
- Yilmaz A, Lipfert B, Cicha I, Schubert K, Klein M, Raithel D, Daniel WG, Garlich CD. 2007. Accumulation of immune cells and high expression of chemokines/chemokine receptors in the upstream shoulder of atherosclerotic carotid plaques. *Exp Mol Pathol*, 82 (3):245-255.
- Yilmaz A, Schaller T, Cicha I, Altendorf R, Stumpf C, Klinghammer L, Ludwig J, Daniel WG, Garlich CD. 2009. Predictive value of the decrease in circulating dendritic cell precursors in stable coronary artery disease. *Clin Sci (Lond)*, 116 (4):353-363.
- Yilmaz A, Lochno M, Traeg F, Cicha I, Reiss C, Stumpf C, Raaz D, Anger T, Amann K, Probst T, Ludwig J, Daniel WG, Garlich CD. 2004. Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques. *Atherosclerosis*, 176 (1):101-110.
- Zeb I, Li D, Nasir K, Malpeso J, Batool A, Flores F, Dailing C, Karlsberg RP, Budoff M. 2013. Effect of statin treatment on coronary plaque progression - a serial coronary CT angiography study. *Atherosclerosis*, 231 (2):198-204.
- Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, Tedder TF. 1992. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol*, 149 (2):735-742.
- Zhou X, Stemme S, Hansson GK. 1996. Evidence for a local immune response in atherosclerosis. CD4+ T cells infiltrate lesions of apolipoprotein-E-deficient mice. *Am J Pathol*, 149 (2):359-366.
- Zlotnik A, Yoshie O. 2012. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*, 36 (5):705-716.

8. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tab. 1: Einteilung der Plaques | 10 |
| Tab. 2: Klassifikation der pAVK nach Fontaine und Rutherford | 12 |
| Tab. 3: Ablauf der Behandlung in der Histokinette | 27 |
| Tab. 4: Primärantikörper, verwendet für die immunhistochemischen Färbungen | 35 |
| Tab. 5: Klinische Daten. n.s.= nicht signifikant | 75 |
| Tab. 6: Vergleich der Zahl der Immunzellen in Plaques bei Patienten mit und ohne Statintherapie | 76 |

9. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Erste atherosklerotische Veränderungen in der Arterienwand (modifiziert nach Libby, 2011)..... | 7 |
| Abb. 2: Fortschreiten der atherosklerotischen Veränderungen (modifiziert nach Libby, 2011) | 9 |
| Abb. 3: Ruptur einer instabilen Plaque (modifiziert nach Libby, 2011)..... | 10 |
| Abb. 4 A: Schema der Plaquegewinnung aus der Arteria carotis interna (Yilmaz et al. 2007)..... | 25 |
| Abb. 4 B: Schema der Plaquegewinnung aus der Arteria femoralis (Förster)..... | 26 |
| Abb. 5: Einteilung der einzelnen Regionen der Plaque, FC-Fibröse Kappe, PS-Plaqueschulter, LC-Lipidkern, M-Media, CL-Contralaterale Seite (Yilmaz et al. 2007)..... | 39 |
| Abb. 6: Trichrom-Färbung einer instabilen Plaque zur Bestimmung der Regionen der Plaque, der Plaqueschulter, der Größe des Lipidkerns und der Dicke der fibrösen Kappe , 20x..... | 40 |
| Abb. 7: CD34-Färbung einer instabilen Plaque mit deutlich sichtbarer Neovaskularisation, 100x | 40 |
| Abb. 8: Immunhistochemische Darstellung von CD68+ Makrophagen/Monozyten. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x | 42 |
| Abb. 9: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD68+ Monozyten/Makrophagen. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm ² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05 | 43 |
| Abb. 10: Immunhistochemische Darstellung von Fascin+ mDCs. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x..... | 43 |
| Abb. 11: Statistische Auswertung des Vorkommens von Fascin+ mDCs. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm ² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05 | 44 |
| Abb. 12: Immunhistochemische Darstellung von S100+ mDCs. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x..... | 44 |
| Abb. 13: Statistische Auswertung des Vorkommens von S100+ mDCs. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm ² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05 | 45 |
| Abb. 14: Immunhistochemische Darstellung von CD83+ reifen mDCs. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x | 45 |
| Abb. 15: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD83+ mDCs. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm ² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05 | 46 |
| Abb. 16: Immunhistochemische Darstellung von CD209+ unreifen mDCs. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x..... | 46 |
| Abb. 17: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD209+ mDCs. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm ² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05 | 47 |

| | |
|---|----|
| Abb. 18: Immunhistochemische Darstellung von CD123+ pDCs. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x | 47 |
| Abb. 19: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD123+ pDCs. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm ² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. | 48 |
| Abb. 20: Immunhistochemische Darstellung von CD304+ pDCs. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x | 48 |
| Abb. 21: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD304+ pDCs. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm ² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. | 49 |
| Abb. 22: Immunhistochemische Darstellung von HLA-DR+ APC. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x | 49 |
| Abb. 23: Statistische Auswertung des Vorkommens von HLA-DR+ APC. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm ² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05 | 50 |
| Abb. 24: Immunhistochemische Darstellung von CD3+ T-Lymphozyten. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x | 50 |
| Abb. 25: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD3+ T-Lymphozyten. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm ² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05 | 51 |
| Abb. 26: Immunhistochemische Darstellung von CD4+ T-Helfer-Zellen. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x | 51 |
| Abb. 27: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD4+ T-Helfer-Zellen. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm ² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05 | 52 |
| Abb. 28: Immunhistochemische Darstellung von CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x | 52 |
| Abb. 29: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD8+ zytotoxischer T-Lymphozyten. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm ² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05 | 53 |
| Abb. 30: Immunhistochemische Darstellung von CD161+ NK-Zellen. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x | 53 |
| Abb. 31: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD161+ NK-Zellen. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm ² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05 | 54 |
| Abb. 32: Immunhistochemische Darstellung von CD25+ aktivierten T-Lymphozyten. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x | 54 |
| Abb. 33: Statistische Auswertung des Vorkommens von CD25+ aktivierter T-Lymphozyten. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm ² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05 | 55 |

| | |
|---|----|
| Abb. 34: Immunhistochemische Darstellung von FoxP3+ Tregs. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x | 55 |
| Abb. 35: Statistische Auswertung des Vorkommens von FoxP3+ Tregs. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm ² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05 | 56 |
| Abb. 36: Immunhistochemische Darstellung von CCR6+ Zellen. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x | 57 |
| Abb. 37: Statistische Auswertung des Vorkommens von CCR6+ Zellen. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm ² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05 | 57 |
| Abb. 38: Immunhistochemische Darstellung von CCR4+ Zellen. Abgebildet ist die immunhistochemische Färbung des Kontrollgefäßes (links), einer Plaqueschulter einer stabilen (Mitte) und einer instabilen Plaque (rechts), Vergrößerung: 100x | 58 |
| Abb. 39: Statistische Auswertung des Vorkommens von CCR4+ Zellen. Dargestellt ist der Median der Zellzahl/0,1 mm ² für Kontrollgewebe, stabile und instabile Plaques. *p<0,05 | 58 |
| Abb. 40: Verteilung der exprimierten Fascin+ mDCs in den einzelnen Regionen der atherosklerotischen Plaques in %. LK= Lipidkern, FK= Fibröse Kappe, PS= Plaqueschultern, KL= Kontralaterale Seite | 59 |
| Abb. 41: Verteilung der exprimierten CD4+ T-Helfer-Zellen in den einzelnen Regionen der atherosklerotischen Plaques in %. LK= Lipidkern, FK= Fibröse Kappe, PS= Plaqueschultern, KL= Kontralaterale Seite | 59 |
| Abb. 42: Verteilung der exprimierten FoxP3+ Tregs in den einzelnen Regionen der atherosklerotischen Plaques in %. LK= Lipidkern, FK= Fibröse Kappe, PS= Plaqueschultern, KL= Kontralaterale Seite | 60 |
| Abb. 43: Korrelation zwischen Fascin+ mDCs und CD4+ T-Helfer-Zellen in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 61 |
| Abb. 44: Korrelation zwischen Fascin+ mDCs und CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 61 |
| Abb. 45: Korrelation zwischen Fascin+ mDCs und CD25+ aktivierten T-Lymphozyten in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 62 |
| Abb. 46: Korrelation zwischen CD4+ T-Helfer-Zellen und CD83+ mDCs in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 62 |
| Abb. 47: Korrelation zwischen CD4+ T-Helfer-Zellen und CD209+ mDCs in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 63 |
| Abb. 48: Korrelation zwischen CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten und CD209+ mDCs in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 63 |

| | |
|---|----|
| Abb. 49: Korrelation zwischen CD25+ aktivierten T-Lymphozyten und CD209+ mDCs in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 64 |
| Abb. 50: Korrelation zwischen Fascin+ mDCs und CD161+ NK-Zellen in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 65 |
| Abb. 51: Korrelation zwischen CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten und CD4+ T-Helfer-Zellen in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 65 |
| Abb. 52: Korrelation zwischen CD83+ mDCs und der CD209+ mDCs in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 66 |
| Abb. 53: Korrelation zwischen Fascin+ mDCs und der HLA-DR+ APC in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 67 |
| Abb. 54: Korrelation zwischen S100+ mDCs und der HLA-DR+ APC in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 67 |
| Abb. 55: Korrelation zwischen CD3+ T-Lymphozyten und der CD25+ aktivierten T-Lymphozyten in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 68 |
| Abb. 56: Korrelation zwischen CD4+ T-Helfer-Zellen und der CD25+ aktivierten T-Lymphozyten in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 68 |
| Abb. 57: Korrelation zwischen CD8+ Zytotoxischen T-Lymphozyten und der CD25+ aktivierten T-Lymphozyten in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 69 |
| Abb. 58: Korrelation zwischen HLA-DR+ APC und CD25+ aktivierten T-Lymphozyten in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 70 |
| Abb. 59: Korrelation zwischen CD3+ T-Lymphozyten und der CCR4+ Zellen in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 71 |
| Abb. 60: Korrelation zwischen FoxP3+ Tregs und CD209+ mDCs in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 72 |
| Abb. 61: Korrelation zwischen FoxP3+ Tregs und CD83+ mDCs in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 72 |
| Abb. 62: Korrelation zwischen FoxP3+ Tregs und CD4+ T-Helfer-Zellen in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 73 |
| Abb. 63: Korrelation zwischen FoxP3+ Tregs und der CCR4+ Zelle in der Gefäßwand in atherosklerotischen Läsionen. Dargestellt ist auf der X- und Y-Achse jeweils die Zellzahl/ 0,1 mm ² | 73 |

10. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------------------|---|
| ACI | Arteria carotis interna |
| ACS | Akutes Koronarsyndrom |
| APC | Antigen-präsentierende Zellen |
| Apo | Apolipoprotein |
| BDCA | blood dendritic cell antigen |
| BMI | body mass index |
| CCR | Chemokin-Rezeptor |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CXCL | Chemokine (C-X-C motif) ligand |
| DC, mDC, pDC | Dendritische Zellen, myeloide dendritische Zellen, plasmacytoide dendritische Zellen |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FoxP3 | forkhead box P3 |
| HDL | High-Density Lipoprotein |
| HIF-1α | Hypoxia-inducible factor |
| HIV | Humanes Immundefizienz Virus |
| HLA-DR | Human leukocyte antigen D-related |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin (z.B. IL-6, IL-2) |
| KHK | Koronare Herzkrankheit |
| LDL | Low-Density Lipoprotein |
| MCP-1 | Monocyte Chemotactic Protein 1 |
| M-CSF | Macrophage Colony-Stimulating Factor |
| MHC | Major histocompatibility complex |
| MIF | macrophage migration inhibitory factor |
| Mip3α | Macrophage Inflammatory Protein 3 Alpha |
| mM | millimolar |
| mRNA | messenger RNA |
| MYD88 | Myeloid differentiation primary response gene |
| NK-Zellen | natürliche Killerzellen |

| | |
|------------------------------|--|
| NKT-Zellen | natürliche Killer-T-Zellen |
| pAVK | periphere arterielle Verschlusskrankheit |
| RNA | Ribonucleinacid |
| TBST | Tris-Puffer mit Tween |
| TGFβ | Transforming growth factor beta |
| Th | T-Helfer |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| VCAM-1 | Vascular-Cell Adhesion Molecule-1 |

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------------|---|
| Name | Atiskova |
| Vorname | Yevgeniya |
| Geburtsdatum | 08.12.1989 |
| Geburtsort | Kiew (Ukraine) |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Familienstand | ledig |
| Eltern | Alexander Atiskov Natalija Atiskova, geb. Sinichenko |

Schulische Ausbildung

| | |
|-------------------|----------------------------------|
| 08/1996 – 07/2000 | Burg-Grundschule, Kelbra |
| 08/2000 – 06/2002 | Sekundarschule, Berga/Kyffhäuser |
| 08/2002 – 07/2008 | Goethegymnasium, Kelbra |
| | Abschluss: Abitur |

Berufliche Ausbildung

| | |
|-----------------------|--|
| 01.10.2008-04.11.2014 | Humanmedizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Note 1,66 |
| 01.07.2011-30.06.2015 | Dissertation Expression dendritischer Zellen, Immunzellen, Chemokinen, Chemokinrezeptoren, HLA-DR, zytotoxischer und regulatorischer T-Lymphozyten in stabilen versus instabilen atherosklerotischen Plaques |
| Ab 01.07.2015 | Assistenzärztin, Augenklinik, UKE Hamburg |

Y. Atiskova

12. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. Atilla Yilmaz, Dr. med. Ilonka Rohm, die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers